

Aminoacylierung von Fragmenten
der Serin- und Phenylalanin- spezifischen
tRNAs aus Hefe

Wolfgang Wübbeler

1975
5



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aminoacylierung von Fragmenten
der Serin- und Phenylalanin- spezifischen tRNAs aus Hefe.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von Wolfgang Wübbeler
aus Graz

München 1975



1. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Hartmann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung:

30. 6. 1975

Meiner Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit von September 1970 bis Februar 1975 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich für die Förderung dieser Arbeit. Herrn Dr. Friedrich Fittler sage ich besonders herzlichen Dank für die stetige Anregung bei der Durchführung der Arbeit. Den Kollegen der Abteilung danke ich für anregende Diskussionen.

Übersicht

Kapitel		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Problemstellung	4
3.	Ergebnisse	8
3.1.	Darstellung von Fragmenten durch chemische Spaltung	8
3.1.1.	Isolierung der Fragmente Ser 1-15,18 und Ser 20,21-85	9
3.1.2.	Analyse des Fragments Ser 1-15,18	14
3.1.3.	Analyse des Fragments Ser 20,21-85	16
3.2.	Darstellung von Fragmenten durch enzymatische Spaltung	20
3.2.1.	Partialsplattungen von tRNA ^{Ser} mit T1-RNase	20
3.2.2.	Darstellung von Fragmenten durch Weiterspaltten von Fragmenten	25
3.2.3.	Analyse des Fragments Ser 36-82	28
3.2.4.	Analyse des Fragments Ser 1,2-30	28
3.2.5.	Partialsplattungen von tRNA ^{Ser} mit N1-RNase	32
3.2.6.	Darstellung von Fragmenten mit Exonucleasen	36
3.3.	Aminosäureeinbau in Fragmente	40
3.3.1.	Ser 36-85	41
3.3.1.1.	Aktivieren durch Erhitzen	42

Kapitel		Seite
3.3.1.2.	Aktivieren durch Mg^{++} -Zugabe	46
3.3.1.3.	Reversible Umwandlung der aktiven in die inaktive Form	47
3.3.2.	Ser 20,21-85	51
3.3.3.	Phe 36-76	55
3.3.4.	Versuche zur Fehlbeladung von Fragmenten	58
3.4.	Aminoacylierung von Fragmentkombinationen	59
4.	Diskussion	63
5.	Experimenteller Teil	68
5.1.	Chemische Spaltungen	68
5.2.	Gelelektrophorese	68
5.3.	Oligonucleotidanalyse	69
5.4.	tRNA, Aminacyl-tRNA-Synthetasen und Aminoacylierungstests	70
5.5.	Apparative Hilfsmittel	71
5.6.	Sonstige Materialien	71
6.	Zusammenfassung der Ergebnisse	72
7.	Literaturverzeichnis	74
8.	Abkürzungen	78

1.

Einleitung

Die fehlerlose Übertragung der genetischen Information aus den Nucleotidsequenzen der Desoxyribonucleinsäure in die Aminosäuresequenzen der Proteine ist für eine lebende Zelle von entscheidender Bedeutung. Diese Übertragung geschieht in zwei Schritten (1):

Im ersten Schritt, der Transcription, bildet sich an der DNA ein komplementärer Matrizen-RNA Strang. Jeweils drei aufeinanderfolgende Nucleotide dieser mRNA codieren für eine bestimmte Aminosäure (2).

Im nächsten Schritt, der Translation, werden diese Codons an den Ribosomen in die entsprechende Aminosäure übersetzt. Dabei ist es die Aufgabe der tRNAs, die richtige Aminosäure auf die wachsende Peptidkette zu übertragen (3). Eine tRNA erfüllt also zwei wichtige Funktionen. Eine Funktion besteht darin, von den 20 verschiedenen natürlichen Aminosäuren nur die richtige über eine energiereiche Esterbindung an die tRNA zu binden, die andere Funktion besteht darin, die Aminosäure nur dann der wachsenden Peptidkette zu übertragen, wenn das Anticodon der tRNA an das Codon der mRNA paßt (4).

Die tRNAs haben ein relativ geringes Molekulargewicht, etwa 30000. Methoden zur Anreicherung und Analyse molekulareinheitlicher tRNAs wurden durch intensive Forschung auf diesem Gebiet erarbeitet (5-11). tRNAs gehören zu den am besten

untersuchten RNA-Molekülen und bieten sich dadurch als Modellmoleküle an. Bis heute wurden ungefähr 60 verschiedene tRNAs in ihrer Primärstruktur aufgeklärt. Die tRNA^{Phe}_{Hefe} ist die einzige Nucleinsäure, deren Tertiärstruktur teilweise aufgeklärt wurde (12). Allen tRNAs gemeinsam sind Nucleotidsequenzen am 3'-Terminus (-C-C-A) und Ähnlichkeiten in der rT-Ψ-C-G-Schleife (13,14), außerdem besteht bei allen tRNAs die Möglichkeit, ihre Primärstruktur in Form eines Kleeblatts darzustellen, sodaß sich optimale Basenpaarung ergibt (5).

Voraussetzung für den richtigen Ablauf mancher Stoffwechselvorgänge sind spezifische Reaktionen von Proteinen mit Nucleinsäuren. Leider weiß man über die Wechselwirkungen zwischen den Reaktionspartnern noch zu wenig. Das gilt auch für die vielen spezifischen Reaktionen zwischen Proteinen und tRNAs.

Die Synthese der seltenen Nucleotide, die in den tRNAs häufiger als in anderen Nucleinsäuren vorkommen, soll als Beispiel dafür angeführt werden (15). In vielen der untersuchten Fälle nimmt man an, daß die Synthese des seltenen Nucleotids durch die modifizierenden Enzyme an der ganzen tRNA vorgenommen wird (16-18). Da diese seltenen Nucleotide an ganz bestimmten Stellen der tRNAs vorkommen, müssen die betreffenden Enzyme diese Stellen spezifisch erkennen können. Dies gilt auch für die CCA-Transferase (19), für die A-Stelle (Aminoacylstelle) und die P-Stelle (Peptidylstelle) der Ribosomen (20), für den Initiationsfaktor (21) und für die Aminoacyl-tRNA-Synthetase.

Diese Erkennungsregionen kann man grob in zwei Gruppen unterteilen. Einerseits gibt es Erkennungsregionen, die allen tRNAs gemeinsam sein müssen, wie zum Beispiel für die CCA-Transferase. Hier erkennt das Enzym eine Struktur oder eine Sequenz, die in allen tRNAs enthalten sein muß. Andererseits gibt es Erkennungsregionen, die bei den verschiedenen tRNAs unterschiedlich sein müssen, um für das betreffende Enzym unverwechselbar zu sein, wie zum Beispiel für die Aminoacyl-tRNA-Synthetase. In diesem Fall erkennt man sowohl die Bedeutung, als auch die Präzision der Nucleinsäure-Protein Wechselwirkungen. Die Wahrscheinlichkeit des Einbaus einer falschen Aminosäure wird mit 1:10000 angegeben (23). Die Synthetase-tRNA Wechselwirkung ist der erste spezifitätsbestimmende Schritt in der Proteinbiosynthese. Bei der Verknüpfung der Aminosäuren zu einem Protein wird nicht noch einmal nachgeprüft, ob die tRNA mit der richtigen oder der falschen Aminosäure beladen ist. Ein Experiment, bei dem eine Cys-tRNA^{Cys} durch Abspaltung der SH-Gruppe in eine Ala-tRNA^{Cys} umgewandelt worden war, zeigte, daß in der Proteinbiosynthese mit dieser falschbeladenen tRNA entsprechend der Adaptorhypothese Alanin statt Cystein in das Protein eingebaut worden war (23).

Die Frage, welcher Teil der tRNA für die Erkennung durch die Aminoacyl-tRNA Synthetase essentiell ist, konnte noch nicht entschieden werden, obwohl dieses Problem bereits an verschiedenen tRNAs mit verschiedenen Methoden untersucht wurde (24,25).

2.

Problemstellung

Um das Strukturelement der tRNA zu finden, welches an der Synthetaseerkennung beteiligt ist, wurden bisher hauptsächlich drei verschiedene Methoden angewendet. Es wurde versucht, die tRNA chemisch zu modifizieren und die Auswirkungen der Modifizierung auf die Akzeptoraktivität zu testen. Der Nachteil dieser Experimente liegt vor allem darin, daß man den Einfluß einer lokalen Veränderung im tRNA-Molekül auf die Tertiärstruktur nicht berechnen kann. Eine andere Methode bedient sich der Tatsache, daß es verschiedene tRNAs gibt, die vom selben Enzym aminoacyliert werden. Man kann daher annehmen, daß sie identische spezifitätsbestimmende Regionen haben. Da noch zu wenige Primärstrukturen isoakzeptierender tRNAs bekannt sind, hat auch diese Methode noch zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt (26). Die dritte, häufig angewendete Methode besteht darin, zu versuchen, Teile des tRNA-Moleküls wegzulassen. Die tRNA wird chemisch oder enzymatisch gespalten, und die Fragmente oder die Fragmentkombinationen werden auf ihre Akzeptoraktivität getestet.

Es zeigte sich nämlich, daß ein Gemisch aus Halbmolekülen nach enzymatischer Spaltung noch aminoacylierbar war. Man fand, daß die tRNA-Hälften allein nicht aminoacylierbar waren; das Gemisch der isolierten Hälften war wieder aktiv (27,28). Daraus läßt sich schließen, daß sich diese Fragmente zu einem Komplex verbunden hatten, dessen Erkennungsregion für die Synthetase intakt war.

Wenn man die Erkennungsregion für die Synthetase finden will, indem man versucht, Fragmente oder Fragmentkombinationen mit einer Aminosäure zu beladen, stellen sich folgende Probleme: Nur wenn ein Fragment oder eine Fragmentkombination, die einen Komplex bildet, spezifisch an die Synthetase bindet und aminoacylierbar ist, kann geschlossen werden, daß das fehlende Stück nicht essentiell für die Enzymerkennung ist. Im umgekehrten Fall, wenn sich die Fragmente oder die Kombinationen nicht aminoacylieren lassen, können keine Schlüsse gezogen werden, da das Nicht-Erkennen außer durch das Fehlen der Erkennungsregion auch durch eine inkompetente Konformation oder durch eine falsche Komplexbildung hervorgerufen werden könnte (29).

Es müssen sich genügend viele Fragmente einer tRNA darstellen lassen, um die tRNA auf möglichst vielfältige Art in Form eines Puzzlespielles, bei dem jeweils ein Teil fehlt, wieder zusammensetzen zu können. Die dabei entstehende Konformation der Erkennungsregion soll sich von der nativen Konformation nicht unterscheiden. Die Fragmente müssen frei von Verunreinigungen sein. Besonders der Teil der Nucleinsäurekette, der im Aminoacylierungstest fehlen soll, muß quantitativ entfernt worden sein. Es wurde nämlich gezeigt, daß bereits eine relativ geringe Konzentration eines Fragments, das die fehlenden Nucleinsäuresequenzen enthält, oder eine geringe Konzentration ganzer tRNA genügen kann, um eine relativ hohe Aminoacylierbarkeit vorzutäuschen (30).

In der vorliegenden Doktorarbeit sollen Methoden untersucht werden, die tRNA^{Ser}_{Hefe} chemisch oder enzymatisch zu spalten. Wenn sich viele verschiedene Fragmente darstellen und isolieren lassen, soll die Erkennungsregion der tRNA^{Ser} für die Seryl-tRNA Synthetase durch Aminoacylierungsversuche der Fragmente und der Fragmentkombinationen genauer lokalisiert werden. Wenn Fragmente unter Standardbedingungen nicht aminoacyliert werden können, sollen Aminoacylierungsbedingungen untersucht werden, bei denen diese Fragmente mit ihrer Aminosäure beladen werden können.

Es soll untersucht werden, ob die Isoliermethoden von Fragmenten verbesserungsfähig sind, um den erforderlichen Reinheitsgrad und höhere Ausbeuten zu erreichen.

Es soll geklärt werden, ob für das Bestehen einer Erkennungsregion die Primärstruktur, die Tertiärstruktur oder beides verantwortlich ist. Darüberhinaus soll untersucht werden, ob das Verhalten vergleichbarer Fragmente verschiedener tRNAs im Aminoacylierungstest übereinstimmt oder Unterschiede zeigt, um Hinweise für oder gegen ein allgemeines Prinzip in der spezifischen Erkennung der tRNAs durch ihre Aminoacyl-tRNA Synthetasen zu erlangen.

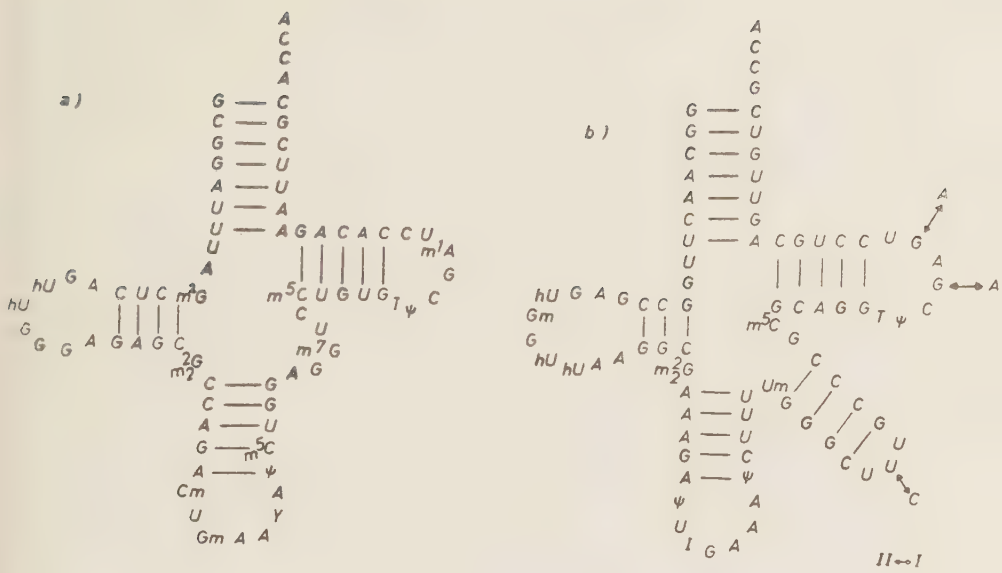


Abb. 1: Kleeblattmodelle

- a) tRNA^{Phe} aus Hefe (31)
- b) tRNA^{Ser}_{I,II} aus Hefe (32)

3.

Ergebnisse

3.1.

Darstellung von Fragmenten durch chemische Spaltung

In der Einleitung wurde erwähnt, daß tRNAs einen relativ hohen Anteil an seltenen Basen haben. Manche dieser seltenen Basen reagieren mit bestimmten Reagentien schneller als andere Basen. Die erhöhte Reaktivität kann man zur Spaltung der Nucleinsäurekette benutzen. Thiebe und Zachau (33) gelang die selektive Abspaltung der Base Y^+ aus $tRNA^{Phe}$; damit bot sich die Möglichkeit, die tRNA an der Stelle des Y^+ zu spalten. (Dieses Verfahren wurde auch im Rahmen dieser Doktorarbeit angewendet, um das Fragment Phe 36-76 darzustellen.) Die Tatsache, daß in der Primärstruktur der $tRNA^{Phe}$ die Base Y^+ nur einmal vorkommt, erleichtert die Gewinnung molekulareinheitlicher Fragmente wesentlich. Aber auch wenn ein seltenes Nucleotid in einer tRNA mehrmals vorkommt, kann man Fragmente darstellen, die zur Untersuchung der Synthetaseerkennungsregion brauchbar sind.

Aus der Primärstruktur der $tRNA^{Ser}$ ist bekannt, daß das hU an den Positionen 16, 18 und 19 vorkommt. Es wurde gezeigt, daß eine Reduktion des hU keinen Verlust der Akzeptoraktivität zur Folge hat (34). So konnte erhofft werden, nach Spaltung der $tRNA^{Ser}$ an diesen Stellen, Fragmente zu isolieren, die entweder allein oder in Kombination mit anderen Fragmenten aminoacylierbar sind. Es gelang bereits im analytischen Maßstab an der $tRNA^{Phe}$ eine Spaltung in der Position der hU vorzunehmen (35).

Das Verfahren zur Spaltung wurde an tRNA^{Ser} versucht; es wurde jedoch so modifiziert, daß auch eine Spaltung im präparativen Maßstab gelingt. Zuerst wurde das hU mit NaBH_4 nach Ref. 34 selektiv reduziert. Das reduzierte hU (= hU' = N-ribosyl-Ureido-propanol) ist säurelabil. Es kann also analog dem Y^+ durch Einwirkung von Säuren von der Ribose abgespalten werden. Um zu verhindern, daß die tRNA^{Ser} bei pH 2,2 ausfällt und die Reaktion dadurch unvollständig oder langsamer abläuft, wurde die Säurebehandlung in 10 M Harnstofflösung durchgeführt. Nach drei Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe einer 50%igen Kaliumacetatlösung gestoppt. Nach einer anschließenden Äthanol-fällung folgte die aminkatalysierte β -Eliminierungsreaktion. (Siehe Abb. 2, Abb. 3) (36).

3.1.1.

Isolierung der Fragmente Ser 1-15,18 und Ser 20,21-85

Die Fragmente wurden durch präparative Gelelektrophorese getrennt und danach isoliert. Es wurde die Methode von Philippsen et al. (37) benutzt. Sie wurde in einigen Punkten verbessert, da sich folgende Probleme stellten. Eine gute Trennung des Fragmentgemisches Ser 20,21-85 von noch ungespaltener tRNA^{Ser} war besonders wichtig. Da sich aus Experimenten mit $\text{tRNA}_{\text{ox}}^{\text{Ser}}$ ein Mechanismus vorstellen läßt, bei dem geringe Mengen tRNA^{Ser} einen relativ hohen Einbau von Aminosäure in das Fragment vortäuschen können (30), sollte ungespaltene tRNA^{Ser} quantitativ entfernt werden. Die zu trennenden Moleküle unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht nur zu etwa 15 %. Eine Trennung durch Gelelektrophorese erfordert in

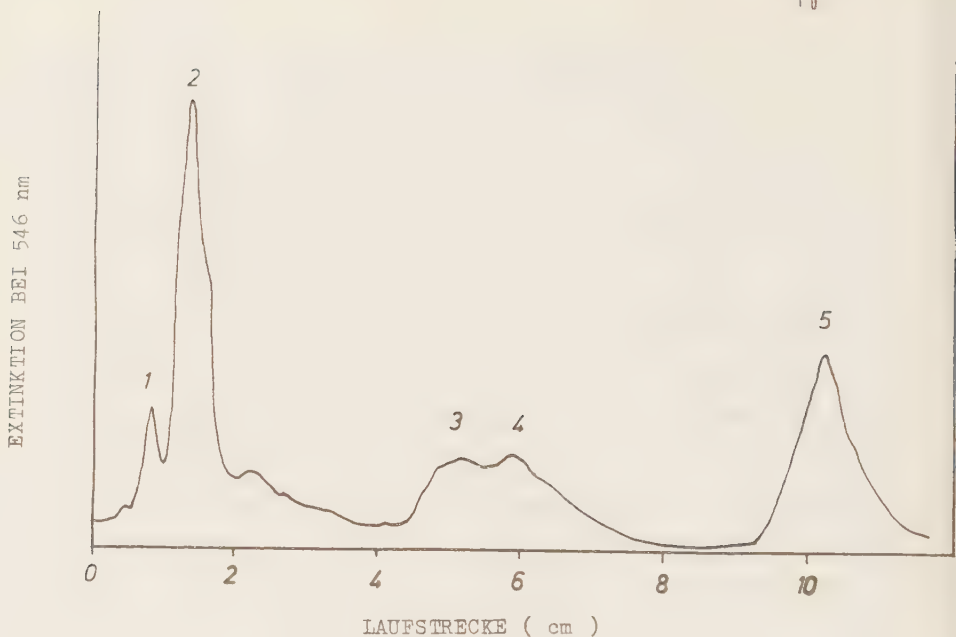


Abb. 1: Densitogramm einer discelektrophoretischen Trennung von 0,05 A_{260} -Einheiten aus einer präparativen chemischen Spaltung 380 A_{260} -Einheiten $tRNA^{Ser}$ wurden mit $NaBH_4$ nach Ref. 34 reduziert. Nach Dialyse und Fällung mit Äthanol wurde die tRNA in 10 ml 10 M Harnstoff, pH 2,2 gelöst und drei Stunden bei 37° inkubiert; die Reaktion wurde mit 5 ml 50 %iger Kaliumacetatlösung gestoppt. Die RNA wurde mit Äthanol gefällt und 2 Stunden bei 25° in 10 ml 0,45 M Anilin, pH 4,5 inkubiert und mit Äthanol gefällt.

1 $tRNA^{Ser}$, 2 Ser 20,21-85, 3 Ser 1-18, 4 Ser 1-15, 5 Bromphenolblau

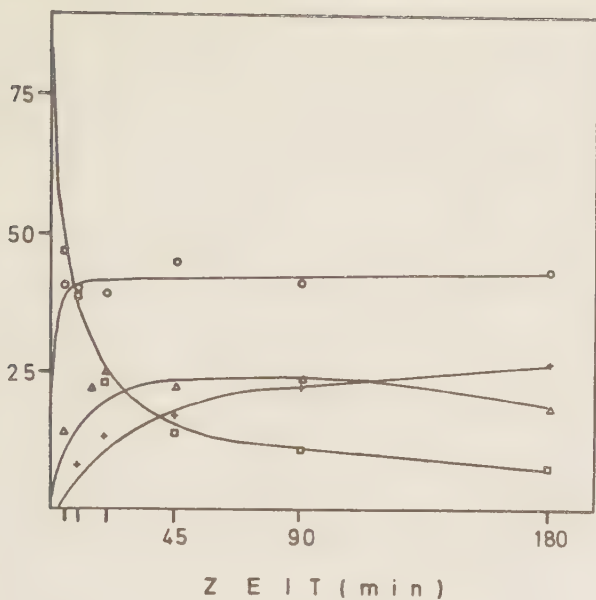


Abb. 3: Prozentuale Zusammensetzung des Inkubationsgemisches (in Abb. 2) bei verschiedenen Zeiten.

Zu den angegebenen Zeiten wurden aus dem Inkubationsgemisch 0,05 A_{260} -Einheiten entnommen, discelektrophoretisch getrennt und aus den Densitogrammen wurde die prozentuale Zusammensetzung bestimmt.

□-□-□ tRNA^{Ser}

○-○-○ Ser 20,21-85

Δ-Δ-Δ Ser 1-18

+--+ Ser 1-15

diesem Fall eine sehr lange Laufstrecke. Das kleinere Fragment Ser 1-15, 18 würde unter Standardbedingungen aus dem Gel gewandert sein, bevor sich das Fragmentgemisch Ser 20, 21-85 von ungespaltener tRNA^{Ser} abgetrennt hätte.

Der Aufbau des präparativen Gels wurde wie folgt geändert:

Die Laufstrecke im Trenngel bestand aus zwei Drittel 10 %igen und aus einem Drittel 16 %igen Trenngel. Nach dem Sammelgel mußte das Nucleinsäuregemisch eine Trennstrecke aus 10 %igen Acrylamid durchlaufen. Danach waren die kleinen Fragmente vom Rest und teilweise auch untereinander getrennt. Der Gelteil, der darunter anpolymerisiert war, bestand aus 16 %igen Polyacrylamid. Dies verzögerte die Wanderungsgeschwindigkeit der kleineren Fragmente sehr und gab den größeren Fragmenten genug Zeit, sich von noch ungespaltener tRNA abzutrennen.

Auch die Methode zur Elution der Fragmente aus dem Gel wurde modifiziert.

Die Färbeprozedur wurde verkürzt, um Verluste durch Diffusion aus dem Gel zu vermeiden. Das 1 cm dicke und in 1 cm breite Streifen geschnittene Plattengel wurde nur zwei Stunden bei 4° unter Schütteln in einer sehr konzentrierten Toluidinblaufärbelösung (50 mg Farbstoff / ml) intensiv angefärbt. Nach dem Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs mit destilliertem Wasser waren die Banden deutlich sichtbar und konnten von den Seitenflächen her gut ausgeschnitten werden. Die ausgeschnittenen und auf -80° gekühlten Gelteile wurden unter Eiskühlung 3 Mal 10 Minuten in 0,5 M NaCl homogenisiert; dabei war der Ultra Turrax auf volle Leistung eingestellt. Nach jedem Homogenisieren

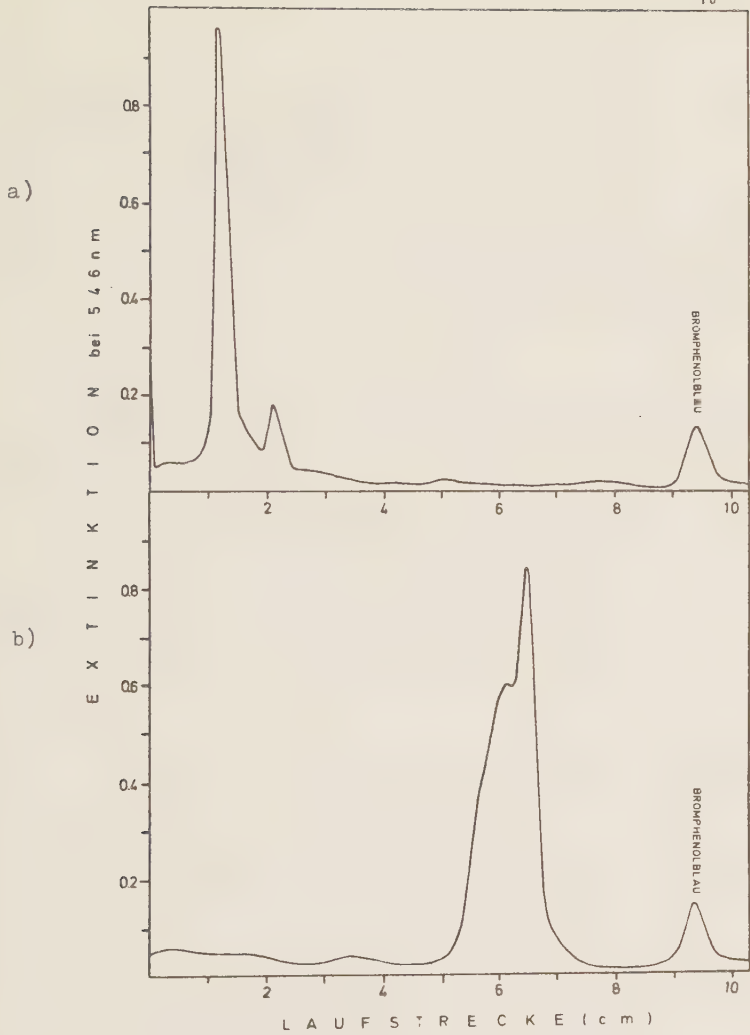


Abb.4: Discelektrophoretische Trennungen der Fragmente

a) Ser 20,21-85

b) Ser 1-15,18

Es wurden jeweils 0,05 A_{260} -Einheiten zur Trennung eingesetzt.

wurden die Gelpartikeln abzentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und das Lösungsmittel bis auf 50 ml im Vakuum abdestilliert. Diese Lösung wurde nach Dialyse auf eine DEAE-Cellulose Säule (3 cm mal 0,8 cm) aufgezogen. Das Fragment wurde mit 0,8 M Lithiumacetat eluiert und anschließend mit Äthanol gefällt.

Die Vorteile dieser Prozedur waren: Bei guter Ausbeute (70-80 %) waren die Fragmente frei von Verunreinigungen durch Gelbestandteile. Durch die bessere Zerkleinerung der Gelpartikel konnte auf die zeitraubende Schüttelmethode verzichtet werden. Die verbesserte Elutionsmethode benötigte weniger als die Hälfte der Zeit, die die Schüttelmethode von Philippsen et al. in Anspruch nahm.

3.1.2.

Analyse des Fragments Ser 1-15,18

Bei der verwendeten Spaltungsmethode wird erwartet, daß die tRNA^{Ser} in der Position der drei hU-Nucleotide gespalten wird. Da die Spaltung an den drei Spaltstellen nicht quantitativ verläuft, kann man drei kleinere Fragmente, drei größere Fragmente und einen Rest an ungespaltenen tRNA erwarten. (Unter den hier angegebenen Bedingungen wurden 10 % der tRNA nicht gespalten.) Folgende Fragmente sollten auftreten: Ser 1-15, Ser 1-18, Ser 1-19; Ser 17-85, Ser 20-85, Ser 21-85. Der Phosphatrest der Spaltstelle sollte am 5'-Terminus der größeren Fragmente bleiben.

Nach der Spaltung und der Isolierung durch Gelelektrophorese wurden zwei Fraktionen gewonnen.

Die Zuordnung der Primärstruktur Ser 1-15, 18 für die erste Fraktion beruht auf zwei Befunden:

1.) Durch Discelektrophorese wurde nachgewiesen, daß dieses Fragmentgemisch aus zwei Fragmenten von etwa gleicher Kettenlänge besteht. Der mengenmäßige Anteil der beiden Fragmente war ungefähr gleich.

2.) In der Oligonucleotidanalyse traten nur die Oligonucleotide der Sequenz Ser 1-18 auf. Ein Oligonucleotid war nur zu etwa 45 % der molaren Menge -bezogen auf ApGp- vorhanden. Auf Grund der Elutionsstelle in der Oligonucleotidauftrennung und nach dem UV-Spektrum konnte es sich nur um das Oligonucleotid $\text{hU}'\text{p m}^2\text{GpGp}$ handeln. Der Primärstruktur der tRNA^{Ser} zufolge ist es das 3'-terminale Oligonucleotid des zu erwartenden Fragments.

Wo blieb das Fragment Ser 1-19, das ebenfalls entstehen sollte? In der Discelektrophorese wurde keine Bande neben den beiden Fragmenten gefunden. In der Oligonucleotidanalyse wäre das hU' , welches nach T_1 RNase Totalspaltung aus dem Fragment Ser 1-19 aufgetreten wäre, durch das Fehlen einer Absorption bei 260 nm nicht aufzufinden gewesen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß der kleine Anteil des Fragments Ser 1-19 durch seine geringe Konzentration im präparativen Gel nicht angefärbt wurde und deshalb auch nicht mit ausgeschnitten wurde.

3.1.3.

Analyse des Fragments Ser 20,21-85

Die Bestimmung der Primärstruktur der Fragmente, aus denen die zweite Fraktion bestand, beruht auf folgenden Befunden:

1.) Nach der T1-RNase Totalspaltung der Fragmente wurde die Oligonucleotidauftrennung mit der ganzen tRNA^{Ser} verglichen. Es zeigte sich, daß alle Nucleotide der Sequenz Ser 23-85 vorhanden waren. Zusätzlich zu diesen Oligonucleotiden wurden zwei gefunden, die in der Analyse ganzer tRNA^{Ser} nicht auftreten. Sowohl Ladung und Kettenlänge, die sich aus der Position der Elution von der DEAE-Cellulose Säule ergaben, als auch die UV-Spektren der beiden Oligonucleotide wiesen darauf hin, daß die tRNA^{Ser} in Position 19 und 20 gespalten worden war und die Oligonucleotide vom 5'-terminalen Ende der Fragmente stammten. (Das für ein drittes Fragment zu erwartende Oligonucleotid war nur in vernachlässigbar geringer Menge vorhanden) Die Mengen der beiden neu auftretenden Oligonucleotide reichten für eine weitere Charakterisierung nicht aus. Daher wurde eine zweite Oligonucleotidauftrennung durchgeführt.

2.) Hierbei war das Gemisch der Fragmente vor der T1-RNase Totalspaltung mit PME vorbehandelt. Die Totalspaltung wurde in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,5 durchgeführt, um eine weitere PME-Aktivität zu verhindern. Nach der Trennung des Oligonucleotidgemisches auf DEAE-Cellulose Säule wurden die beiden Oligonucleotide, die bei der ersten Trennung zusätzlich aufgetreten waren, nicht mehr gefunden. Dafür traten zwei Oligonucleotide bei einer niedrigeren Salzkonzentration auf. Dieser Befund konnte nur auf folgende Weise erklärt werden:

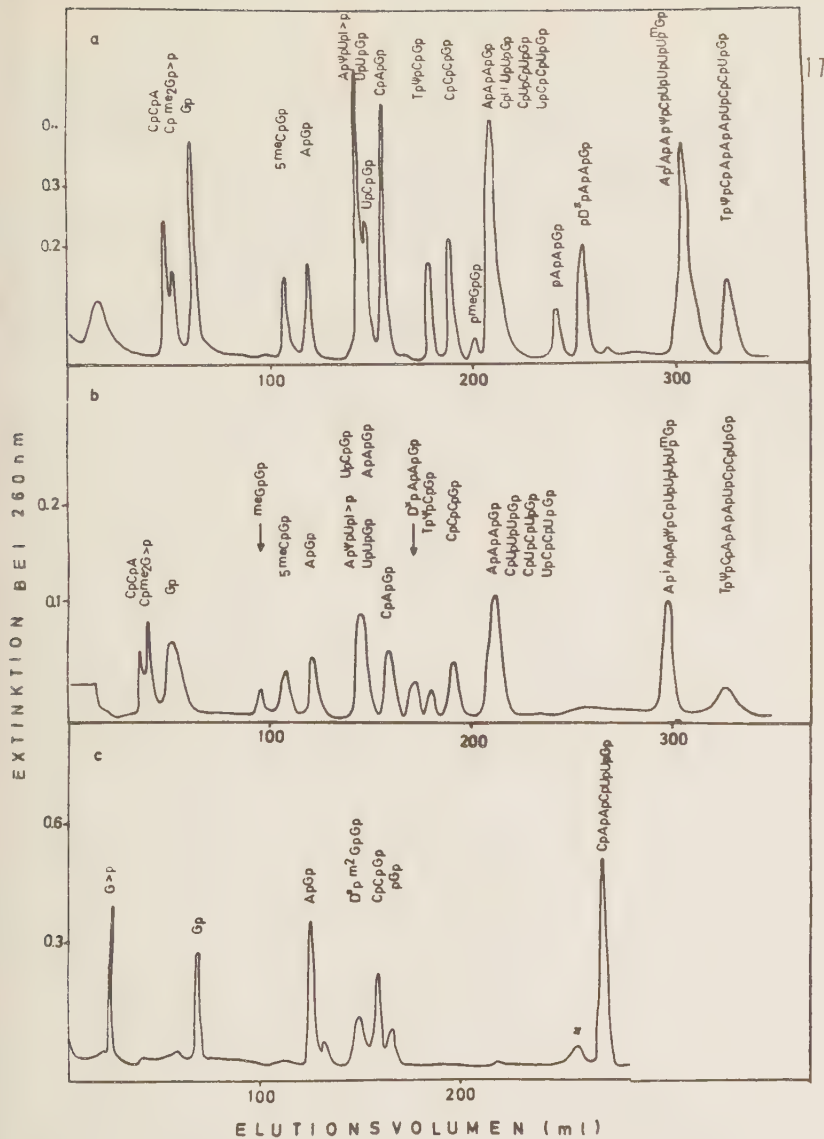


Abb. 5: Elutionsprofile von Totalhydrolysaten mit T1-RNase

- a) 16 A_{260} -Einheiten Ser 20,21-85
- b) 15 A_{260} -Einheiten Ser 20,21-85, nach PME-Behandlung
- c) 8 A_{260} -Einheiten Ser 1-15,18

Tabelle 1: Oligonucleotidanalyse des Fragments Ser 1-15,18.

Die Wanderungsgeschwindigkeiten auf Papierelektrophorese, die Verhältnisse der Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen und die Wellenlängen der Maxima der Absorption wurden mit den in der Literatur angegebenen Werten verglichen (32); die Differenz war nie größer, als 20%. Nur endständige "p" sind angeführt.

Spaltprodukt	A ₂₆₀ -Einheiten	$\frac{\text{Mol}}{\text{Mol AGp}}$
G>p	0,74	1,37
Gp	0,76	1,4
AGp	1,17	1,0
hU'GGp	0,49	0,44
CCGp,	0,40	0,69
pGp	0,27	0,5
nicht analysiertes	} 0,2	
Oligo *		
CAACUUGp	2,14	0,7

Tabelle 1: Oligonucleotidanalyse des Fragments Ser 20,21-85.

Die Wanderungsgeschwindigkeit auf Papierelektrophorese, das Verhältnis der Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen und die Wellenlängen der Maxima der Absorption wurden mit den in der Literatur angegebenen Werten verglichen (32); die Differenz war nie größer als 20 %. Nur endständige "p" sind angeführt.

Spaltprodukt	A ₂₆₀ -Einheiten	$\frac{\text{Mol}}{\text{Mol CCGp}}$
CCA	0,6	0,95
C ^{me} 2G>p	0,54	1,0
Gp	1,3	-
5 ^{me} CGp	0,42	1,1
AGp	0,48	0,79
A ^{me} UI>p	} 1,6	2,1
UUGp		
UCGp	0,71	1,1
CAGp	1,56	2,1
T CGp	0,49	0,65
CCCGp	0,71	1,0
p ^{me} GGp	0,05	0,085
AAAGp, CUUUGp,	} 2,6	2,6
CUCUGp, UCCUGp		
pAAGp	0,29	0,34
A ⁱ AA ^{me} CUUUU ^{me} Gp	2,1	1,04
T CAAAUCCUGp	0,63	0,33
phU'AAGp	0,85	1,01

Aus den molaren Mengen der beiden 5'-terminalen Oligonucleotide ergibt sich ein Verhältnis Ser 21-85 : Ser 20-85 = 1 : 0,34.

Bei den zusätzlich aufgetretenen Oligonucleotiden handelte es sich um solche, die vom 5'-Terminus der Fragmente stammen. Ohne PME-Behandlung hatten diese Oligonucleotide ein 3' und ein 5'Phosphat. Die PME-Behandlung entfernte vor der zweiten Totalspaltung die Phosphatreste an den Molekülenden, daher fehlte diesen Oligonucleotiden das 5'-terminale Phosphat, und sie wurden bei niedrigerer Salzkonzentration eluiert.

3.2.

Darstellung von Fragmenten durch enzymatische Spaltung

3.2.1. Partialsplattungen mit T1-RNase

Um tRNA Fragmente durch enzymatische Spaltung darzustellen, werden stets Bedingungen gewählt, bei denen nur wenige Stellen des tRNA-Moleküls durch Enzyme angreifbar sind (5,6,32). Bestimmte Regionen der tRNAs werden bevorzugt gespalten, während andere besonders geschützt sind. Wenn man davon ausgeht, daß die Raumstruktur der tRNA dafür verantwortlich ist, daß es überhaupt präferentielle Spaltstellen gibt, müßte es möglich sein, durch Veränderung der Raumstruktur der tRNA neue Spaltstellen zu schaffen.

Durch die Entfernung der Mg^{++} -Ionen kann die tRNA^{Ser} in eine denaturierte Form überführt werden, die nicht mehr aminoacylierbar ist (39). Wenn man während der Spaltung der denaturierten tRNA^{Ser} mit T1-RNase die Enzymkonzentration gering hält, die Lösung einen pH-Wert außerhalb des pH-Optimums der Nuclease hat und die Temperatur so niedrig hält (0°), daß sich die denaturierte Form nur sehr langsam in die native umlagert, tritt ein Fragment als Spaltprodukt auf, das bei der Spaltung der nativen tRNA^{Ser}

nicht gefunden wird. Das neue Fragment Ser 1-45,47 entsteht dabei in ungefähr gleicher Menge, wie das Fragment Ser 36-82,85. Die Position 82 als Spaltstelle ist weniger stark ausgeprägt.

Da sich die Entfernung der Mg^{++} -Ionen als wirksame Methode zur Änderung der Raumstruktur und damit zur Darstellung eines neuen Fragments erwiesen hatte, sollte nun versucht werden, mit anderen Methoden die Raumstruktur der $tRNA^{Ser}$ zu verändern in der Hoffnung, dadurch neue Fragmente darstellen zu können.

Es sollte auf möglichst vielfältige Weise versucht werden, die Raumstruktur der $tRNA^{Ser}$ zu verändern, um verschiedene Stellen der $tRNA$ für einen Angriff durch die T1-RNase exponieren zu können.

In Tabelle 3 sind einige Möglichkeiten, präferentielle Spaltstellen zu finden, aufgeführt. Die $tRNA^{Ser}$ wurde mit dem jeweils angegebenen Reagens vorbehandelt und durch die T1-RNase unter limitierenden Bedingungen gespalten. Fragmente, die dabei zusätzlich zu den bei Standardbedingungen gefundenen Fragmenten auftraten und bei einer genügend großen Ausgangsmenge an $tRNA^{Ser}$ gewonnen werden könnten, wurden tabellarisch zusammengefaßt. Sie sind in der Folge steigender Wanderungsgeschwindigkeit in der analytischen Gelelektrophorese dargestellt. Die vorbehandelte $tRNA^{Ser}$ wurde, wenn nicht anders angegeben in 0,1 Tris HCl pH 7,5 bei 37° 2-60 min mit T1-RNase inkubiert.

Tab. 3: Versuche zur Auffindung neuer Spaltstellen an der tRNA^{Ser}. Die Spaltung der tRNA^{Ser} wurde durch die T1-RNase durchgeführt, nachdem die tRNA auf folgende Weise vorbehandelt worden war:

- a) chemische Modifizierung durch Acrylnitril (38).
- b) Salzbildung mit voluminösen Kationen (Tri-n-butylamin) (8,9)
- c) interkalierende Komplexbildner (Ethidiumbrumid) (39)
- d) Zusatz organischer Lösungsmittel (Pyridin, Dimethylsulfoxyd)
- e) teilweises Schmelzen der tRNA^{Ser} in Harnstoff
- f) Veränderung des pH-Wertes

R _{BB} -Wert des Fragments	Vorbehandlung der tRNA nach	Mg ⁺⁺ - Konz. (M)	T1-RNase-Konz. in E / ml
0,16	d)	0,02	125
0,17	b)	EDTA	1,25
0,18	d)	0,02	125
0,205	d)	0,02	125
0,22	b)	EDTA	1,25
0,23	d)	0,02	125
0,25	b)	EDTA	1,25
0,265	c)	EDTA	1,25
0,27	d)	0,02	125 (10 ⁰)
0,46	b)	EDTA	1,25
0,57	b)	EDTA	1,25
0,66	b)	EDTA	1,25

a) Nach der chemischen Modifizierung der tRNA^{Ser} durch Acrylnitrilbehandlung war die tRNA^{Ser} nur noch zu etwa zwei Drittel - im Vergleich zu unbehandelter tRNA^{Ser} - aminoacylierbar (38). Nach Spaltung durch T1-RNase wurde neben dem Spaltmuster, das unter Standardspaltbedingungen auftrat, eine große Anzahl anderer Fragmente nachgewiesen. Die Konzentration der einzelnen neu aufgetretenen Fragmente war sehr gering.

b) Es wurde das Tri-n-butylamin - tRNA^{Ser} - Salz dargestellt. Die T1-RNase-Spaltung erfolgte an den präferentiellen Spaltstellen der Standardbedingung. Zusätzlich wurden einige kleinere bis mittelgroße Fragmente nachgewiesen (ca. 25-40 Nucleotide lang), deren Aufarbeitung sich nicht gelohnt hätte, da die Ausbeute zu gering gewesen wäre.

c) Bei einem molaren Verhältnis tRNA^{Ser}: Ethidiumbromid = 1:50 waren die günstigsten Bedingungen für die Spaltung zu einem neu auftretenden Fragment. Die Laufstrecke dieses Fragments in der analytischen Gelelektrophorese entsprach der des Fragments Ser 1-45,47. Es wurde nicht weiter untersucht. Bei höheren Ethidiumbromidkonzentrationen wurde die Nuclease gehemmt.

d) Bei Spaltungen in 20 %igem und in 40 %igem Pyridin traten die in Tabelle 3 aufgeführten Fragmente neu auf. Ein fast identisches Spaltmuster wurde bei Spaltungen in 30 %igem Dimethylsulfoxyd gefunden. Die relativen Mengen der neu aufgetretenen Fragmente waren sehr gering.

e), f) Eine andere Möglichkeit, eventuell neue Spaltstellen zu finden, war das teilweise Schmelzen der tRNA^{Ser} in Harnstoff. Es konnten jedoch keine präferentiellen Spaltstellen gefunden werden. Dies gilt auch für Spaltungsversuche der tRNA bei pH 4,5 mit sehr hohen Enzymkonzentrationen.

Das Ergebnis all dieser Experimente war, daß bei den verwendeten Methoden an der tRNA^{Ser} keine neuen Spaltstellen auftraten, die die Aufarbeitung neuer Fragmente rentabel gemacht hätten. Dieses Ergebnis kann als Hinweis dafür gelten, daß die native Tertiärstruktur der tRNA^{Ser} verglichen zu anderen tRNAs relativ stabil ist.

Fragmente, die in geringer Ausbeute entstehen, aber die für Experimente zur Auffindung der Erkennungsregion nützlich wären, kämen für eine Isolierung trotz geringer Ausbeuten in Betracht. Das gilt besonders für ein Fragment der tRNA^{Ser}, dessen CCA-Ende noch unversehrt ist. Daher wurden Versuche unternommen, ein solches Fragment zu finden. Es wurde eine tRNA^{Ser} dargestellt, deren CCA-Ende durch den Einbau radioaktiven Cytosins markiert war. Diese tRNA wurde bei Bedingungen, bei denen sehr viele neue Fragmente auftraten (b,c) gespalten, das Fragmentgemisch wurde disclektrophoretisch getrennt. Im Bereich der Fragmente mit Kettenlängen von ca. 80-15 Nucleotiden wurde keine Radioaktivität gefunden. Dies ließ den Schluß zu, daß bei allen verwendeten Bedingungen das CCA-Ende durch die T1-RNase leicht angreifbar war und daß das Oligonucleotid CpCpA vom 3'-terminalen Ende der tRNA^{Ser} bevorzugt abgespalten wurde.

3.2.2.

Darstellung von Fragmenten durch Weiterspalten von Fragmenten

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung neuer Fragmente der tRNA^{Ser} bestand darin, statt von tRNA^{Ser} von isolierten Fragmenten der tRNA auszugehen und diese zu spalten. Bei isolierten Fragmenten vermutet man in manchen Fällen intermolekulare oder intramolekulare Basenpaarung, sodaß sich die Raumstruktur des Fragments deutlich unterscheidet von der Struktur, die das Fragment als Bestandteil ganzer tRNA haben würde (40,41). Vor allem konnte angenommen werden, daß bei isolierten Fragmenten manche Spaltstellen, die in der ganzen tRNA geschützt sind, frei-liegen und der RNase zugänglich sind. So war zu erhoffen, daß sich einerseits neue Spaltstellen finden lassen, andererseits eine weitere Spaltung primär gebildeter Fragmente zu Oligonucleotiden unterbleibt. Um diese Möglichkeit zur Darstellung neuer Fragmente zu untersuchen, wurden die Spaltmuster von Fragmenten und Fragmentkombinationen mit den Spaltmuster der tRNA^{Ser} verglichen. Es zeigte sich, daß Fragmente alleine oder Fragmentkombinationen, die instabile Komplexe bilden (Kap. 3.4.), schneller abgebaut werden, als tRNA^{Ser} und daß dabei einige neue Fragmente auftreten.

Aus diesen Beobachtungen ergaben sich Konsequenzen für die weitere Forschung. Um Fragmente durch Weiterspalten von Fragmenten darstellen zu können, werden größere Mengen des Ausgangsmaterials tRNA^{Ser} benötigt, da sich bei den einzelnen Schritten Verluste nicht vermeiden lassen. Die tRNA^{Ser} wurde nach Ref. 6 dargestellt.

Das Zwischenprodukt zur Darstellung von Fragmenten durch Weiterspaltan von Fragmenten war bevorzugt das Fragment Ser 36-85. Erwünscht war eine möglichst hohe Ausbeute an CCA-Hälfte. Eine Trennung der Fragmente aus $\text{tRNA}_1^{\text{Ser}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Ser}}$ oder eine Trennung der Fragmente Ser 1-34(-ac) und Ser 1-34 (+ac) war nicht erforderlich. Deshalb wurden die Fragmente anstatt durch Säulenchromatographie (30) durch präparative Gelelektrophorese getrennt. Bei der Darstellung der tRNA^{Ser} -Hälften, die zur Weiterspaltung verwendet wurden, konnte zu Gunsten einer höheren Ausbeute ein geringerer Reinheitsgrad in Kauf genommen werden. Das Fragmentgemisch Ser (1,2) 36-82,85 wurde zur Darstellung molekulareinheitlicher Fragmente, die für Aminoacylierungstests benötigt wurden, über eine zweite präparative Gelelektrophorese getrennt. Dabei wurde folgende Methode versucht und erfolgreich angewendet:

Das als Doppelbande auftretende Fragmentgemisch wurde nach dem ersten Lauf der präparativen Gelelektrophorese gefärbt, ausgeschnitten und die Gelpartikeln auf -80° gekühlt. Sie wurden mit dem bei der Elektrophorese üblichen Sammelgelpuffer überschichtet und im Ultra Turrax homogenisiert. Der Gelbrei wurde 6 Stunden gegen Sammelgelpuffer dialysiert und anschließend mit einem dem Volumen des Gelbreis entsprechenden Gemisch der Substanzen zur Polymerisation versetzt und an ein Sammelgel anpolymerisiert. Bei der Elektrophorese wurde die Laufstrecke im Trenngel so weit ausgenutzt, daß das kürzere Fragment Ser 36-82 durch das gesamte Trenngel wandern konnte. Dadurch wurde bei guter Ausbeute eine gute Trennung der beiden Fragmente erreicht, obwohl sie sich in ihrem Molekulargewicht nur um etwa 6 % unterscheiden.

Wenn das Fragmentgemisch Ser 36-82,85 nach nur einem Trennungsschritt aus dem Gel eluiert worden war, konnte es wegen Verunreinigungen durch andere Fragmente nicht für einen Aminoacylierungstest verwendet werden. Zur Weiterspaltung durch T1-RNase war es aber geeignet. Auf diese Weise wurden drei verschiedene Fragmente dargestellt und isoliert. Die Mengen der isolierten Fragmente reichten für eine Oligonucleotidanalyse nicht aus. Die Kettenlängen dieser Fragmente wurden aus den Wanderungsgeschwindigkeiten in der analytischen Gelelektrophorese annähernd bestimmt. Aus dem Vergleich der Kettenlängen mit den möglichen Spaltstellen einer T1-RNase-Spaltung konnte man annehmen, daß es sich bei den drei Fragmenten um folgende handelte:

Ser 36-79, Ser 36-76 und Ser 44-79.

Die Primärstruktur dieser Fragmente ließ sich mit dieser Methode keinesfalls beweisen; jedoch sind bei den jeweiligen Kettenlängen andere Spaltstellen nicht wahrscheinlich.

Das Fragment Ser 1-34 trat bei elektrophoretischer Trennung stets als Doppelbande auf ($\frac{1}{4}$ ac, Ref. 30). Die aus dem präparativen Gel gewonnene Fraktion war, wie durch analytische Gelelektrophorese nachgewiesen wurde, nicht durch andere Fragmente verunreinigt und konnte dadurch sowohl zur Aminoacylierung, als auch zur Weiterspaltung durch die T1-RNase verwendet werden. Auf diese Art wurden drei Fragmente dargestellt und isoliert. Die Mengen des einen isolierten Fragments waren für eine Oligonucleotidanalyse ausreichend; die Analyse wird im Kapitel 3.2.4. beschrieben. Die Mengen der beiden anderen Fragmente waren für eine Analyse nicht ausreichend; ihre Primärstruktur konnte nicht bestimmt werden.

3.2.3.

Analyse des Fragments Ser 36-82

Bei den Aufarbeitungen zur Gewinnung des molekulareinheitlichen Fragments Ser 36-85 mit der im Kap. 3.2.2. beschriebenen Methode über eine zweimalige Gelelektrophorese fiel stets eine größere Menge eines um einige Nucleotide kürzeren Fragments an. Es wurde vermutet, daß es sich dabei um das Fragment Ser 36-82 handelte, da im Aminoacylierungstest der Komplex dieses Fragments mit dem Fragment Ser 1-34 nur eine sehr geringe Akzeptoraktivität hatte. Um die Primärstruktur zu beweisen, wurde eine T1-RNase Totalspaltung durchgeführt und die Oligonucleotide auf einer DEAE-Cellulose Säule getrennt. Alle Oligonucleotide stammten von der Sequenz Ser 36-82, das Oligonucleotid CpCpA wurde nicht gefunden. Damit war die Primärstruktur des Fragments sichergestellt.

3.2.4.

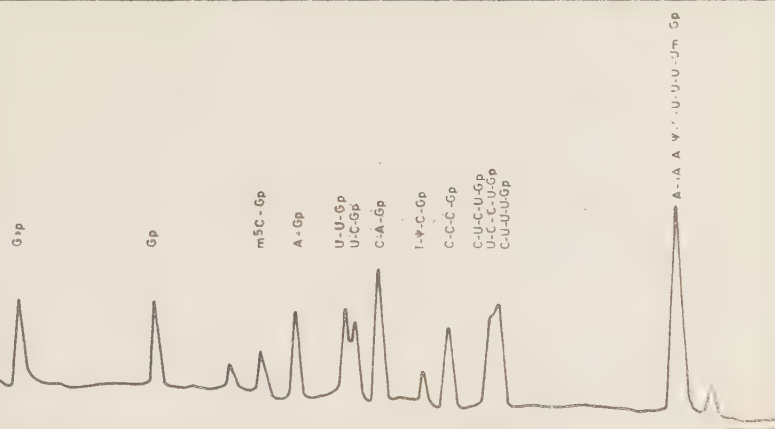
Analyse des Fragments Ser 1,2-30

Das durch Weiterspalten des Fragments Ser 1-34 dargestellte Fragment wurde total gespalten. Bei der Analyse des Oligonucleotidgemisches wurden alle Oligonucleotide der Sequenz Ser 1-30 gefunden. In der Primärstruktur der tRNA^{Ser} befinden sich am 5'-terminalen Ende zwei aufeinanderfolgende Guanosin-Nucleotide. Die in der Analyse aufgetretene Menge an G ließ vermuten, daß das endständige G teilweise fehlte, und daß es sich bei diesem Fragment um das Gemisch der Fragmente Ser 1-30 und Ser 2-30 handelte.

a)

EXTINKTION bei 260 nm

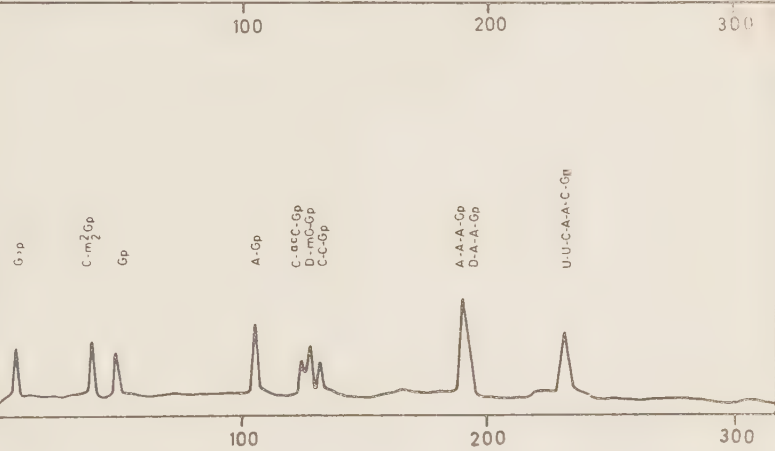
0.2
0.1



b)

EXTINKTION

0.5
0.25
0



ELUTIONSVOLUMEN (ml)

Abb. 6: Elutionsprofile von Totalhydrolysaten mit T1-RNase

a) Ser 36-82 (11 A₂₆₀-Einheiten)

b) Ser 1,2-30 (6 A₂₆₀-Einheiten)

Tabelle 4: Oligonucleotidanalyse des Fragments Ser 36-82.

Die Wanderungsgeschwindigkeiten auf Papierelektrophorese, die Verhältnisse der Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen und die Wellenlängen der Maxima der Absorption wurden mit den in der Literatur angegebenen verglichen (32); die Differenz war nie größer, als 20 %. Nur endständige "p" sind angeführt.

Spaltprodukt	A ₂₆₀ -Einheiten	$\frac{\text{Mol}}{\text{Mol CCGp}}$
G>p	0,27	2,4
Gp	0,26	2,4
5 ^{me} CGp	0,15	1,0
AGp	0,29	0,9
UUGp	0,26	0,93
UCGp	0,22	0,85
CAGp	0,45	1,6
T U CGp	0,1	0,2
CCCGp	0,29	1,0
CUCUGp, UCCUGp, CUUUGp	0,66	1,6
A ⁱ AACUUUGp	0,92	1,1

Tabelle 5: Oligonucleotidanalyse des Fragments Ser 1,2-30.

Die Wanderungsgeschwindigkeiten auf Papierelektrophorese, die Verhältnisse der Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen und die Wellenlängen der Maxima der Absorption wurden mit den in der Literatur angegebenen verglichen (32); die Differenz war nie größer, als 20 %. Nur endständige "p" sind angeführt.

Spaltprodukt	A ₂₆₀ -Einheiten	$\frac{\text{Mol}}{\text{Mol C}^{\text{me}}_2\text{Gp}}$
G>p	0,32	1,2
C ^{me} ₂ Gp	0,45	1,0
Gp	0,23	0,9
AGp	0,58	1,0
C ^{ac} CGp	0,31	0,5
hU ^{O-me} GGp	0,47	0,87
CCGp	0,35	0,6
AAAG	1,46	1,6
hUhUAAGp		
UUCAACGp	1,0	0,7

3.2.5.

Partialspaltungen von tRNA^{Ser} mit N1-RNase

Die Darstellung der N1-RNase aus *Neurospora crassa* und ihre Eigenschaften wurden von Takai et al. (44) und von Takagi et al. (45) beschrieben. Die N1-RNase hat (wie auch die T1-RNase) die Eigenschaft, eine spezifische Spaltung der Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-terminalen Phosphatrest eines Guanodin und einer benachbarten Base zu katalysieren. Intermediär entsteht dabei ein Cyclo-phosphat. Die Aktivität, dieses Cyclo-phosphat zu hydrolysieren, ist bei der T1-RNase um etwa den Faktor 10 größer als bei der N1-RNase (44).

Es wurde der Unterschied zwischen den beiden Enzymen bei limitierenden Bedingungen untersucht. Unter der Voraussetzung, daß nur die Tertiärstruktur der tRNA für die Ausbildung präferentieller Spaltstellen verantwortlich ist, erwartet man ein identisches Spaltmuster bei einer T1-RNase- und bei einer N1-RNase-Spaltung. Liegt es am Enzym, daß manche Phosphodiesterbindungen schneller als andere gespalten werden, könnten bei den verschiedenen Spaltungen verschiedene Spaltmuster auftreten. Pinder und Gratzner nahmen diese Möglichkeit an und folgerten daraus, daß die beiden Enzyme verschiedene sogenannte "subsites" hätten, die zu verschiedenen Regionen der tRNA verschieden große Affinitäten haben (46).

Unterschiede in der Affinität lassen sich am besten erkennen, wenn der zeitliche Verlauf der Spaltungen mit den beiden Enzymen miteinander verglichen wird. Es ergab sich, daß unter Standardbedingungen sowohl die Spaltprodukte, als auch der zeitliche Verlauf ihrer Entstehung identisch waren (Abb. 7). Wenn es also diese "subsites" gibt, hätten sie im Falle der tRNA^{Ser} dieselben Affinitäten.

Unterschiede zwischen den Enzymen konnten aber gefunden werden, wenn die Spaltung nicht bei Standardbedingungen, sondern in 20 mM EDTA durchgeführt wurde. Bei diesen Bedingungen unterschieden sich die beiden Enzyme in der Abbaugeschwindigkeit der durch den Mg⁺⁺-Verlust destabilisierten tRNA^{Ser}. Die tRNA^{Ser} wurde sehr schnell zu Oligonucleotiden abgebaut, ohne daß sich irgendwelche Fragmente anreicherten. Die T1-RNase spaltete die tRNA etwa 10 Mal schneller als bei Standardbedingungen, die N1-RNase etwa 100 Mal schneller als bei Standardbedingungen. Die Größenordnung der Abbaugeschwindigkeiten wurde aus dem Vergleich der Densitogramme bestimmt, die von den elektrophoretisch getrennten Proben aus dem Spaltungsgemischen mit den beiden Enzymen angefertigt wurden.

Bei dieser Art der Spaltung ist es theoretisch möglich, jedes Fragment, das durch eine Spaltung neben G entstehen kann, darzustellen. Die Gewinnung von Fragmenten scheiterte aber an der Schwierigkeit einer Trennung der vielen Fragmente. Diesbezügliche Versuche brachten keine molekulareinheitlichen Fraktionen.

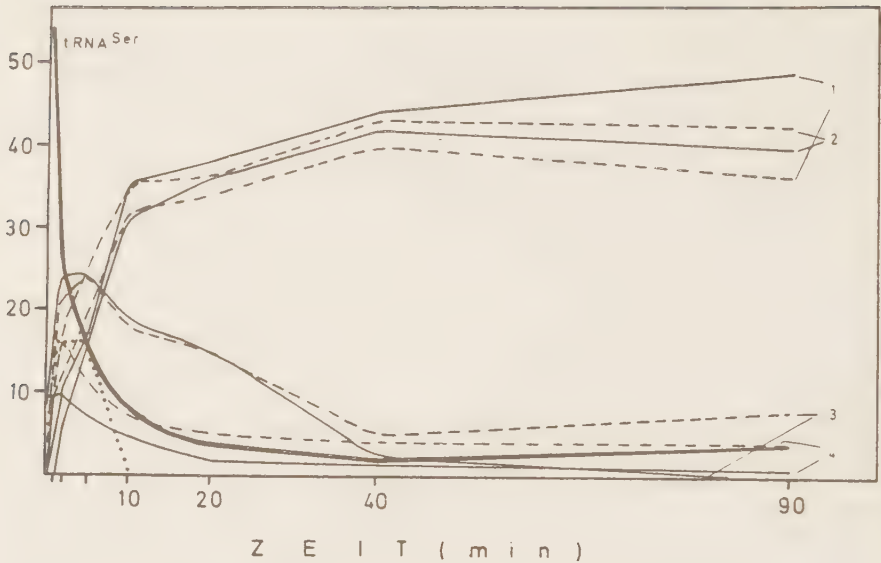


Abb. 7: Prozentuale Zusammensetzung des Inkubationsgemisches einer Spaltung der $tRNA^{Ser}$ unter limitierenden Bedingungen mit T1-RNase (—) und mit N1-RNase (----) bei verschiedenen Zeiten.

1 Ser 36-82

2 Ser 1-34

3 Ser 36-85

4 Ser ?

(.....) Ser ?, identische Mengen bei den beiden verschiedenen Spaltungen.

Die Spaltungen wurden mit jeweils 2 A_{260} -Einheiten $tRNA^{Ser}$ -Lösung nach Ref. 30 durchgeführt; die Enzymaktivitäten der T1-RNase und der N1-RNase waren gleich hoch. Die Enzyme wurden von der Fa. Sankyo Co., Tokio bezogen; die Enzymeinheiten waren vom Hersteller angegeben; es wurden die in Ref. 30 verwendeten Enzymaktivitäten eingesetzt.

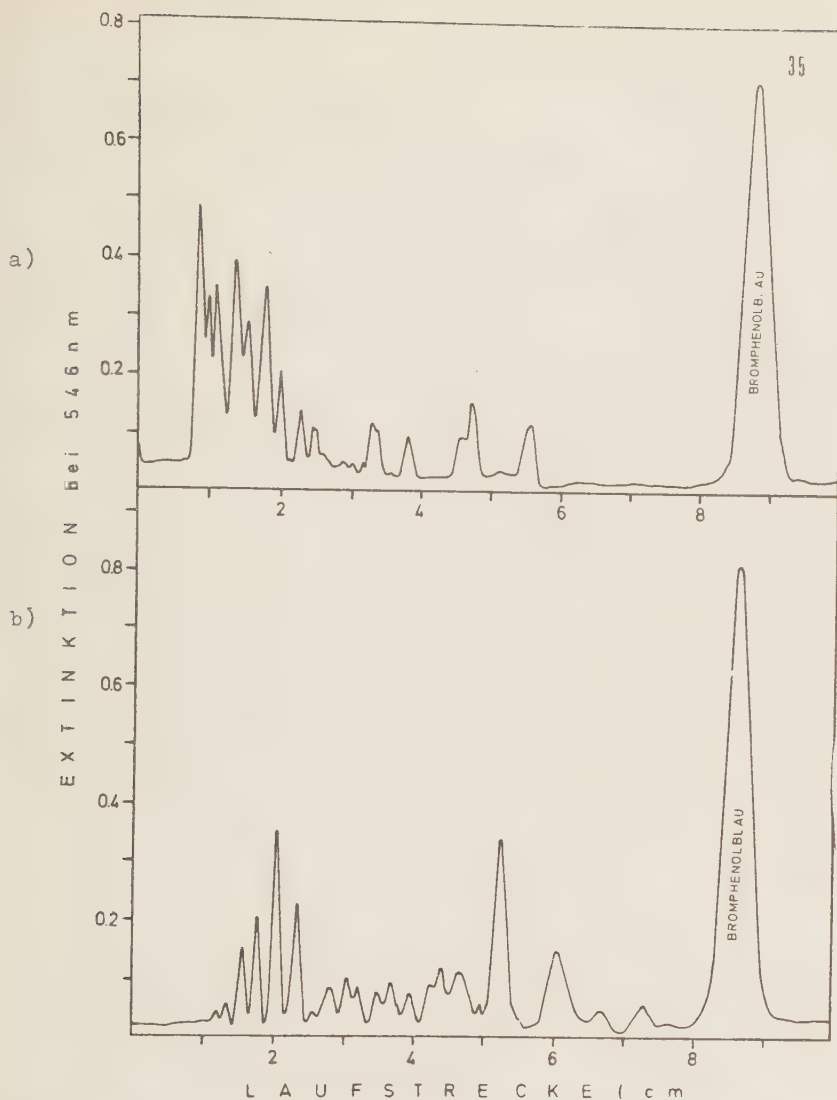


Abb. 8: Densitogramme discelektrophoretischer Trennungen des Gemisches einer tRNA^{Ser} -Spaltung unter limitierenden Bedingungen in 20 mM EDTA. 1 A_{260} -Einheit tRNA^{Ser} -Lösung wurde mit entweder
a) 12,5 mE T1-RNase 10 min oder mit
b) 1,25 mE N1-RNase 6 min inkubiert. Die Spaltungen wurden nach Ref. 30 durchgeführt, die Trennungen nach Ref. 37 in einem 16 %igen Trenngel.

3.2.6.

Darstellung von Fragmenten mit Exonucleasen.

Exonucleasen bauen RNAs unter schrittweiser Abspaltung jeweils eines Nucleotids von den Molekülenden her ab; die aus Schweine- milz nach Ref. 47 gewonnene Phosphodiesterase vom 5'-Terminus her, die Phosphodiesterase aus Schlangengift vom 3'-Terminus her (48). Die Geschwindigkeit des Abbaus der einzelnen Nucleotide ist aber verschieden. Daher häufen sich im Inkubationsgemisch von tRNAs mit Exonucleasen manche Fragmente an (49). An den sogenannten Stoppstellen baut das Enzym das nächste Nucleotid langsamer ab oder es dissoziiert von der tRNA ab. Als Grund vermutet man sowohl Strukturelemente der tRNAs (häufig treten Stoppstellen am Beginn eines Doppelstrangs auf), als auch manche seltene Basen (z.B.: hU) Fragmente, die durch Abbau mit Exonucleasen gewonnen werden können, entstehen in relativ schlechter Ausbeute, da der Unterschied der Hydrolysegeschwindigkeit zwischen Stoppstellen und anderen Stellen gering ist.

Es wurde nun versucht, diesen Unterschied durch chemische Modifizierung zu vergrößern. Das hU läßt sich mit NaBH_4 spezifisch zu Ureidopropanolribose reduzieren (34). In der hU-Schleife der tRNA^{Ser} befinden sich drei hU-Nucleotide. Sie sind beim Abbau mit Milz-PDE eine schwache Stoppstelle (49). Nach deren Reduktion wurde die dephosphorylierte tRNA^{Ser} mit Milz-PDE inkubiert, und der Abbau wurde mit dem Abbau nicht-reduzierter tRNA^{Ser} verglichen (Philippsen et al. Ref. 49). Es zeigte sich, daß im Inkubationsgemisch der reduzierten tRNA^{Ser} ein Fragment in höherer Ausbeute auftrat.

Dieses Fragment blieb gegenüber einem weiteren Abbau durch die Milz-PDE relativ stabil. Der Wanderungsgeschwindigkeit in analytischer Gelelektrophorese zufolge hatte es eine Kettenlänge von ca. 70 Nucleotiden. Das entspräche einer Stoppstelle in Position 16 (Ureidopropanolribose), der Position, an der die Milz-PDE auf die erste reduzierte hU-Base vom Molekülende her trifft. Das Fragment wurde im präparativen Maßstab dargestellt und isoliert. Nach Totalspaltung mit T1-RNase wurde das Gemisch der Oligonucleotide auf DEAE-Cellulose Säule getrennt. Es wurden die Oligonucleotide der Sequenz Ser 22-85 gefunden. Die Oligonucleotide des 5'-Terminus des Fragments traten bei der Totalspaltung ganzer tRNA nicht auf. Für eine Analyse reichten die vorhandenen Mengen nicht aus, so konnte der 5'-Terminus dieses Fragments nicht mit Sicherheit festgelegt werden.

Obwohl durch Reduktion des hU die Stoppstelle ausgeprägter wurde, konnte das Fragment Ser 16?-85 nicht in zufriedenstellender Ausbeute bei präparativen Darstellungen gewonnen werden. Das durch chemisch Spaltung dargestellte Fragment Ser 20,21-85 war in guten Ausbeuten leicht zugänglich. Dieses Fragment ist dem Fragment Ser 16?-85 sehr ähnlich, daher wurde die Darstellung des Fragments Ser 16?-85 durch Milz-PDE nicht weiter angewendet.

Es wurden auch Versuche unternommen, statt von tRNA^{Ser} von Fragmenten der tRNA auszugehen und diese mit Exonucleasen abzubauen, um neue Fragmente darstellen zu können. Mit Milz-PDE gelang es, aus dem dephosphorylierten und reduzierten Fragment Ser 1-34 im analytischen Maßstab ein tRNA^{Ser}-Viertel darzustellen. Mit Schlangengift-PDE wurden folgende Fragmente dargestellt: Im präparativen Maßstab wurde das Fragment Ser 1-34 abgebaut, und es entstand ein um etwa 6 Nucleotide kürzeres Fragment. Die vorhandenen Mengen reichten für eine weitere Analyse nicht aus.

Aus dem Fragment Ser 36-85 entstand durch Abbau mit Schlangengift-PDE ein um etwa 10 Nucleotide kürzeres Fragment. Nach der Totalspaltung dieses Fragments mit T1-RNase und anschließender Auftrennung der Oligonucleotide auf DEAE-Cellolose Säule wurden die Oligonucleotide der Sequenz Ser 36-73 gefunden. Das am 3'-terminalen Ende darauffolgende Oligonucleotid aus einer T1 RNase Totalspaltung wäre CpApGp. Es wurde nicht aufgefunden. Da die Schlangengift-PDE Nucleotide mit einem 5'-terminalen Phosphatrest freisetzt, hätte ein Oligonucleotid mit folgender Sequenz entstehen müssen:

CpApG,

CpA oder

C.

Um welches es sich dabei handelte, konnte nicht mit Sicherheit geklärt werden. Die Primärstruktur war also entweder Ser 36-74, Ser 36-75 oder Ser 36-76. Aus der Analogie des Abbaus ganzer tRNA^{Ser} mit Schlangengift-PDE (50) wurde vermutet, daß es sich um das Fragment Ser 36-76 handelte.

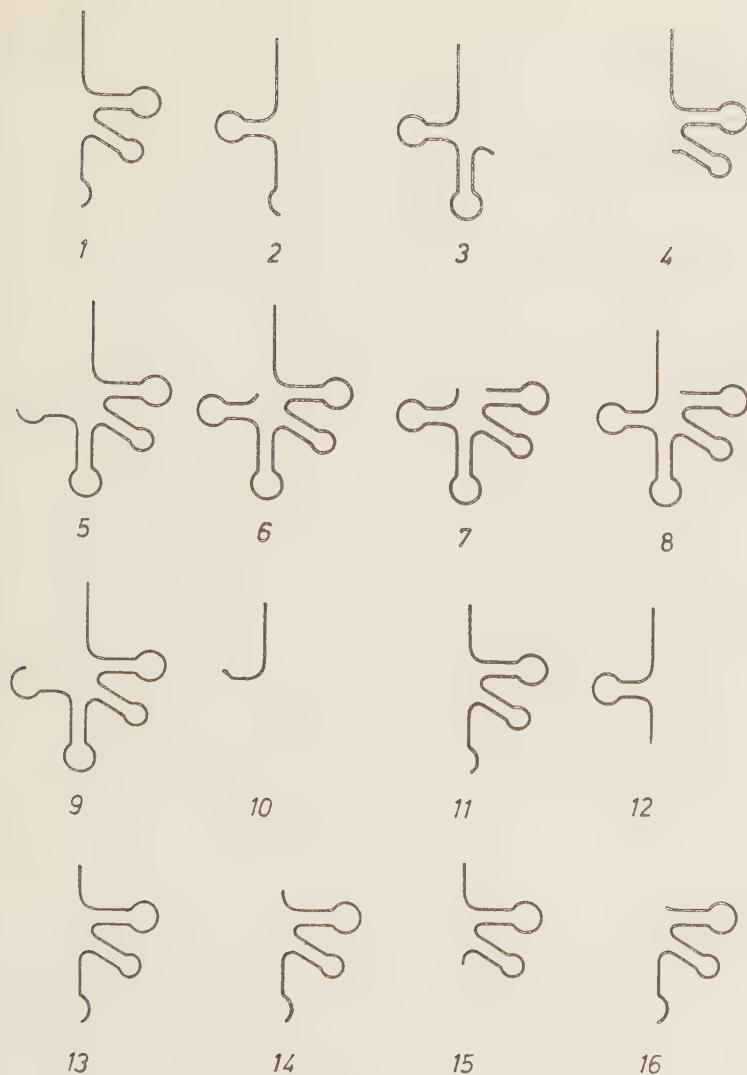


Abb.9: Fragmente der tRNA^{Ser}, dargestellt in Kleeblattform

- 1: Ser 36-85 (30); 2: Ser 1-34 (30); 3: Ser 1-45,47 (38);
 4: Ser 44-85 (36); 5: Ser 16?-85 (36); 6: Ser 9,11-85 (36);
 7: Ser 68N (50); 8: Ser 1-76 (50); 9: Ser 20,21-85 (3.1.1.);
 10: Ser 1-15,18 (3.1.1.); 11: Ser 36-82 (3.2.3.); 12: Ser 1,2-30
 (3.2.2.); 13: Ser 36-79, 14: Ser 36-76 und 15: Ser 44-79 (3.2.2.
 16: Ser 36-76? (3.2.6.)

3.3.

Aminosäureeinbau in Fragmente

Die Probleme zur Auffindung der Erkennungsregion durch die Fragmentmethode wurden im Kap. 2 besprochen.

Das Ziel solcher Untersuchungen kann immer nur die Aufstellung eines Negativkatalogs sein, der sich aus den Daten vieler Einzelversuche zusammensetzt. Bei allen diesen Versuche müssen Fragmente oder Fragmentkombinationen durch die Synthetase mit der richtigen Aminosäure beladbar sein. Je kleiner der Teil der Nucleinsäurekette der tRNA ist, der noch aminoacylierbar ist, umso besser läßt sich die Erkennungsregion einengen. Das könnte man am einfachsten natürlich dann, wenn die Erkennungsregion nahe dem CCA-Ende läge und wenn ein nur sehr kurzes Stück der Nucleinsäurekette, das das CCA-Ende enthält, mit der Aminosäure beladen werden könnte.

Tatsächlich scheint der Akzeptorstamm bei manchen tRNAs eine wichtige Rolle bei der Enzymerkennung zu spielen. Dies wurde am Beispiel der tRNA^{Ala} beschrieben (25). Aus diesen Versuchen geht aber nicht eindeutig hervor, ob das Nicht-Erkennen des veränderten tRNA-Moleküls durch die Synthetase wegen einer Veränderung des 5'-terminalen Endes der Nucleinsäurekette oder wegen einer damit verbundenen Veränderung der Tertiärstruktur verursacht wurde.

3.3.1.

Ser 36-85

Die Akzeptoraktivität des Fragments Ser 36-85 wurde bereits untersucht (30). Dabei wurden Hinweise gefunden, daß das Fragment schon in Abwesenheit der komplementären tRNA^{Ser}-Hälfte (Ser 1-34) beladbar ist. Von insgesamt 17 Präparationen des Fragments Ser 36-85 waren 9 aminoacylierbar. Die dabei beobachtete Akzeptoraktivität schwankte im Bereich von 0,05-0,35 pMol Serin / pMol Ser 36-85. Das Ausmaß der Beladbarkeit des Fragments mit Aminosäure war bei verschiedenen Präparationen verschieden hoch; außerdem war bei derselben Präparation im Zeitraum einiger Wochen eine mehr oder weniger schnelle Abnahme der Akzeptoraktivität zu beobachten. Das konnte nicht mit einem Abbau des Fragments durch Nucleasen erklärt werden, da das Fragment nach Gelelektrophorese unverändert rein war und sich auch die Aminoacylierbarkeit des Fragments in Kombination mit dem komplementären Fragment Ser 1-34 nicht verändert hatte.

Diese Befunde wurden auf folgende Weise erklärt: Es wurde vermutet, daß das Fragment Ser 36-85 die Sequenz zur Erkennung durch die Synthetase enthält. Manchmal wird das Fragment in einer aktiven und ein anderes Mal in einer inaktiven Form gewonnen. Die aktive Form ist metastabil. Nicht geklärt konnte werden: Welche Bedingungen ließen die aktive Form entstehen? Was ist die Ursache für die verschiedene Umwandlungsgeschwindigkeit in die inaktive Form bei den einzelnen Präparationen? Kann die inaktive Form wieder aktiviert werden?

Aktive und inaktive Konformationen der tRNA^{Ser} sind bereits bekannt und wurden hier erwähnt (Kap. 3.2.1.). Es zeigte sich, daß die Stabilität einer bestimmten Tertiärstruktur im hohen Maß von der Konzentration zweiwertiger Ionen abhängt. Außerdem lassen sich bestehende Raumstrukturen sehr einfach durch Temperaturerhöhung zerstören. Auf das Problem übertragen, die aktive Konformation des Fragments Ser 36-85 reproduzierbar zu erhalten, heißt das, daß durch Variation der Mg^{++} -Ionenkonzentration und der Vorinkubationstemperatur die aktive Konformation des Fragments Ser 36-85 erhalten werden könnte.

Zuerst mußten für die verschiedenen Präparationen identische Ausgangsbedingungen geschaffen werden. Dies galt insbesondere für die Salzkonzentration. Deshalb wurden die zweiwertigen Ionen nach Ref. 38 durch Dialyse gegen EDTA entfernt. Nach dieser Behandlung war keine Präparation des Fragments Ser 36-85 unter Standardbedingungen aminoacylierbar.

3.3.1.1.

Aktivieren durch Erhitzen

tRNA^{Ser} neigt unter bestimmten Bedingungen dazu, Aggregate z.B. Dimere zu bilden (51). Dabei verringert sich die Akzeptoraktivität. Die Dimere können durch kurzzeitiges Erhitzen wieder in aktive Monomere überführt werden. Deshalb werden bei manchen Aminoacylierungstests die tRNAs 2-5 Minuten in 5 mM Mg^{++} auf 60-85° erhitzt, bevor sie dem Aminoacylierungsgemisch zugegeben werden. (52)

Es wurde nun versucht, auch bei dem Fragment Ser 36-85 durch Vorinkubation eine aktive Konformation zu erhalten. Dies gelang bei sehr niedriger Mg^{++} -Konzentration (1-3 mM Mg^{++}) und nach sehr kurzer Erhitzungsdauer. Danach konnte in einem unmittelbar darauffolgenden Aminoacylierungstest das Fragment Ser 36-85 mit Serin beladen werden. In dem oben angegebenen Bereich der Mg^{++} -Konzentration, und nach einem 1-3 Minuten langen Erhitzen war das Fragment stets aktiv, das Ausmaß der Beladung war aber unter analogen Bedingungen und mit derselben Präparation bei verschiedenen Tests verschieden hoch. Daher war es schwierig die Optima für die Variablen (Mg^{++} -Konzentration, Temperatur, Inkubationsdauer beim Erhitzen) zu finden. Aus den vielen Vorversuchen bei verschiedenen Bedingungen wurden diejenigen ausgesucht, bei denen das Ausmaß der Beladung am besten reproduzierbar war. Für das Fragment Ser 36-85 ergaben sich folgende Vorinkubationsbedingungen: Erhitzungsdauer 1,75 min, Mg^{++} -Konzentration 1,75 mM, Temperatur 60° . Die Vorinkubation wurde in 0,05 M Cacodylat pH 7,0 durchgeführt.

Um eine für alle Versuche identische Erhitzungs- und Abkühlungsgeschwindigkeit zu erreichen, wurden die Vorinkubationen in einem eigens dafür konstruierten Inkubationsgefäß durchgeführt. Es war ein thermostatisiertes, dünnwandiges Glasgefäß, in dem die Temperatur innerhalb 10 sec von 37° auf 60° und umgekehrt verändert werden konnte. Alle hier erwähnten Vorinkubationen wurden in diesem Glasgefäß durchgeführt; die Zugabe des Aminoacylierungsgemisches erfolgte, wenn nicht anders angegeben, 15 sec nach dem Abkühlen auf 37° .

Der zeitliche Verlauf der Beladung des Fragments mit Aminosäure wurde untersucht. Es zeigte sich, daß das Fragment sehr schnell aminoacyliert wurde und das Ausmaß der Beladung nach kurzer Zeit abnahm. In Proben, die länger als 20 Minuten mit dem Gemisch zur Aminoacylierung inkubiert worden waren, konnten keine mit Serin beladenen Fragmentmoleküle nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen: Das Fragment Ser 36-85 war nach Entfernung der Mg^{++} -Ionen in einer inaktiven Konformation und konnte von der Synthetase nicht beladen werden. Nach Erhitzen in verdünnter Mg^{++} -Lösung entstand eine Konformation, die von der Synthetase als die richtige erkannt wurde und das Fragment wurde mit Serin beladen. Im Inkubationsgemisch zur Aminoacylierung wurde das beladene Fragment chemisch oder enzymatisch deacyliert. Gleichzeitig bildete sich wieder eine inaktive Konformation. Diese konnte aber nicht mehr mit der Aminosäure beladen werden, und der Anteil der beladenen Fragmentmoleküle nahm ab.

Eine andere Erklärung wäre ein Abbau des Fragments durch Nucleasen. Die Synthetasepräparation könnte Nucleasen enthalten, und Fragmente werden durch Nucleasen im Vergleich zu ganzer tRNA besonders schnell abgebaut (Kap. 3.2.2.). Daher wurde durch analytische Gelelektrophorese überprüft, ob das Fragment im Inkubationsgemisch abgebaut worden war. Die Densitogramme der disclektrophoretischen Auftrennungen von Proben vor und nach der Inkubation mit der Synthetase wurden miteinander verglichen, und es wurden keine Anzeichen eines Abbaus durch Nucleaseverunreinigung festgestellt.

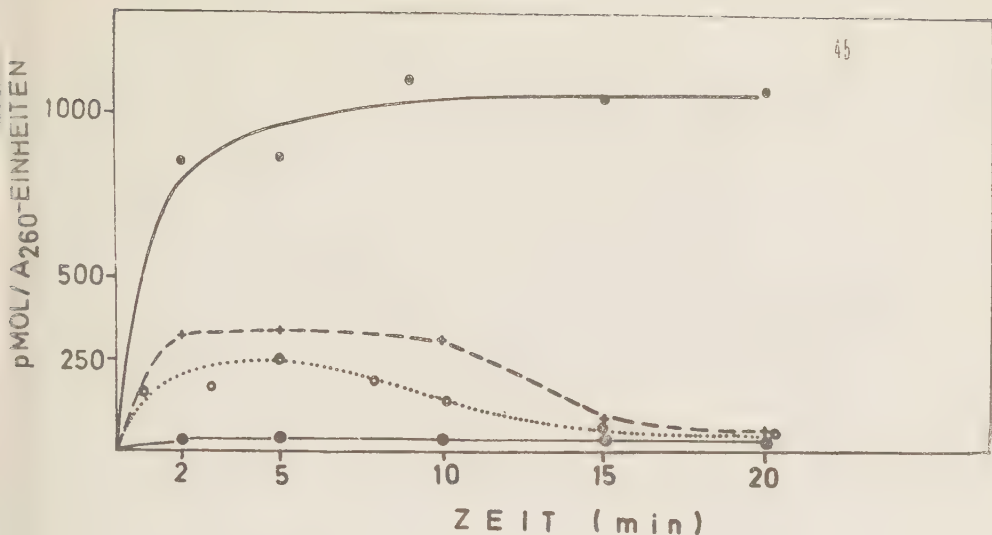


Abb. 10: Aminoacylierung von Ser 36-85.

0,3 A_{260} -Einheiten Ser 36-85 wurden in 0,5 ml Puffer (1,75 mM $MgCl_2$, 5mM Kaliumcacodylat, pH 7,0) für 1,75 min auf 60° erhitzt und 15 sec nach dem Abkühlen mit 200 mikro-Einheiten Seryl-tRNA-Synthetase unter Standardbedingungen inkubiert. Je 0,1 ml des Gemisches wurden in Zeitabständen entnommen und mit Trichloressigsäure gefällt.

++++ Ser 36-85 mit Vorinkubation

Ser 36-85 ohne Vorinkubation

.... Ser 36-85 unmittelbar nach Mg^{++} Zugabe

●●●● 0,5 A_{260} -Einheiten $tRNA^{Ser}$ mit Vorinkubation

Die Akzeptoraktivität schwankte bei den verschiedenen Versuchen und den verschiedenen Präparationen (insgesamt 6) zwischen 0,1 und 0,36 pMol Serin/ pMol Ser 36-85. Obwohl die Bedingungen stets gleich waren, traten auch Schwankungen bei verschiedenen Aminoacylierungsversuchen mit einem Fragment aus derselben Präparation auf. Dafür konnte keine Erklärung gefunden werden. Zur Übersicht wurden die Ergebnisse von voneinander unabhängigen Experimenten mit dem Fragment Ser 36-85 aus verschiedenen Präparationen in Tabelle 6 zusammengefaßt. Innerhalb eines Versuchs lagen die Werte für die Akzeptoraktivität annähernd auf einer Kurve. (Tab. 6 siehe Seite 50).

Das Fragment Ser 36-85 war bei allen Aminoacylierungstests, bei denen diese Art der Vorinkubation angewendet wurde, mit Aminosäure beladbar. Die Hinweise dafür, daß die Sequenz zur Erkennung durch die Synthetase in der Sequenz Ser 36-85 enthalten sein muß (30), wurden durch diese Versuche wesentlich bekräftigt.

3.3.1.2.

Aktivieren durch Mg^{++} Zugabe

Bei den meisten Versuchen zur Aminoacylierung des Fragments Ser 36-85 wurde zur Kontrolle das nicht-aktivierte Fragment denselben Inkubationsbedingungen zur Aminoacylierung ausgesetzt, wie das aktivierte Fragment. Bei keiner Präparation und bei keinem Versuch gelang es, das Mg^{++} -frei dialysierte Fragment ohne Vorbehandlung mit Aminosäure zu beladen.

Zur Ausbildung der aktiven, aber offensichtlich metastabilen Konformation des Fragments Ser 36-85 wurde nach Zugabe von Mg^{++} erhitzt. Es wurde aber auch versucht, allein durch Zugabe von Mg^{++} -Ionen zur Mg^{++} -frei dialysierten Fragmentlösung ein biologisch aktives Fragment zu erhalten. Wenn bei 37° eine Mg^{++} -Pufferlösung mit der Fragmentlösung gemischt wurde, sodaß die Endkonzentration an Mg^{++} 2mM war, gelang es, analog zur Aktivierung durch Erhitzen, in einem unmittelbar darauffolgenden Aminoacylierungstest das Fragment Ser 36-85 mit Serin zu beladen.

Das Ausmaß der Beladung lag auch in diesem Fall zwischen 0,1 und 0,36 pMol Serin / pMol Ser 36-85. Auch hier traten Schwankungen bei verschiedenen Aminoacylierungsversuchen mit Fragmenten aus verschiedenen Präparationen und mit Fragmenten aus derselben Präparation auf.

3.3.1.3.

Reversible Umwandlung der aktiven in die inaktive Form

Die aktive Konformation konnte durch Mg^{++} Zugabe erhalten werden. 3-5 Minuten nach der Zugabe der Mg^{++} Pufferlösung war das Fragment wieder inaktiv. Durch Erhitzen wurde diese Konformation zerstört. Nach dem Abkühlen lag das Fragment in einer biologisch aktiven Konformation vor. Um die Reversibilität der Konformationsänderung zu beweisen, mußte aus dem danach wieder inaktiv gewordenen Fragment durch einen zweiten Erhitzungsschritt erneut ein aktives Fragment erhalten werden. Dies gelang nicht bei jedem Versuch.

Eine zweite Aktivierung durch Erhitzen gelang immer nur dann, wenn das Fragment vor dem zweiten Erhitzungsschritt die genau gleiche Behandlung wie vor dem ersten Erhitzungsschritt durchlaufen hatte. Das Fragment war in Lösung eingefroren, wurde im Eisbad aufgetaut, bei 37° inkubiert und auf 60° kurzzeitig erhitzt. Danach hatte es im Aminoacylierungstest nach dem zweiten Erhitzen nahezu dieselbe Akzeptoraktivität, wie nach dem ersten Erhitzen. Die Gründe dafür sind unbekannt.

Folgende Konformationsänderungen wurden nachgewiesen:

Inaktiv (nach Dialyse) $\rightarrow$ aktiv (nach Mg^{++} Zugabe) $\rightarrow$
 inaktiv (nach 30 min bei 37°) $\rightarrow$ aktiv (durch Erhitzen) $\rightarrow$
 inaktiv (nach 30 min bei 37°) $\rightarrow$ aktiv (2. Erhitzen nach Einfrieren) $\rightarrow$
 inaktiv (nach 30 min bei 37°).

Die reversible Umwandlung der aktiven in die inaktive Konformation war ein Beweis für die Abhängigkeit der Aminoacylierbarkeit von der nativen Konformation.

Um die Geschwindigkeit der Umwandlung von aktiver in die inaktive Form untersuchen zu können, wurde folgender Versuch unternommen: Die Aktivität des Fragments wurde in einem genau 3 min dauernden Aminoacylierungsversuch getestet. Bei den einzelnen Proben war der Zeitraum zwischen Erhitzung und Zugabe des Aminoacylierungsgemischs verschieden groß. Es wurde die Akzeptoraktivität in Abhängigkeit des Zeitraums zwischen Erhitzung und Zugabe des Aminoacylierungsgemisches gemessen.

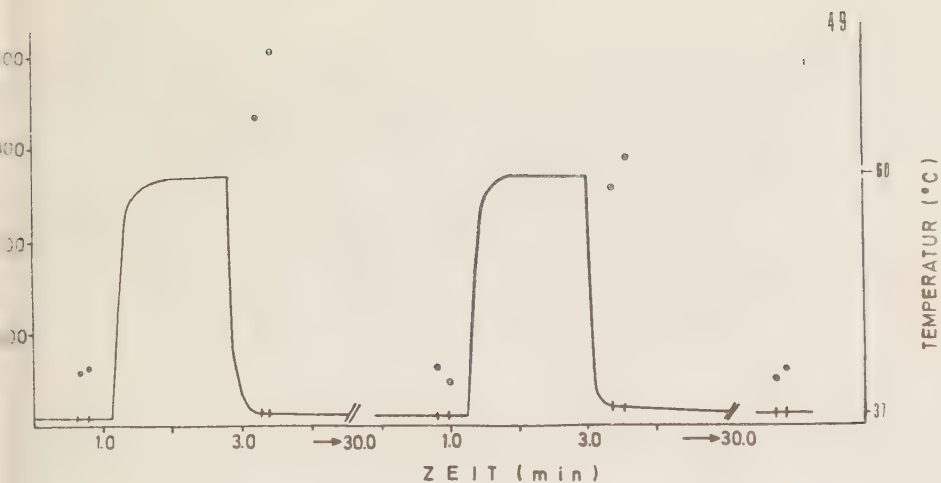


Abb. 11: Reversible Umwandlung biologisch aktiver und inaktiver Konformationen von Ser 36-85.

0,3 A_{260} -Einheiten Ser 36-85 wurden in 0,9 ml Puffer (1,75 mM $MgCl_2$, 5mM Kaliuncacodylat, pH 7,0) in einem an zwei Thermostaten (60° bzw. 37°) angeschlossenen Mantelgefäß inkubiert. Aliquote Teile von 0,03 A_{260} -Einheiten wurden zu den in der Abb. gezeigten Zeiten entnommen und die Akzeptoraktivität (3min bei 37°) bestimmt.

●●● Akzeptoraktivität

— Temperaturverlauf der Probe

Tabelle 6: Akzeptoraktivität von Ser 36-85 nach Vorinkubation.

Bei verschiedenen Aminoacylierungsexperimenten mit dem Fragment Ser 36-85 schwankte das Ausmaß der Aminoacylierung stärker als mit der intakten tRNA^{Ser}.

Die Ergebnisse von 5 voneinander unabhängigen Experimenten sind deshalb in Form einer Tabelle angeführt. Die Akzeptoraktivität ist in pMol Serin /pMol Ser 36-85 angegeben.

Experi- ment	vor Erhitzen ^a	15 sec nach erstem Erhitzen ^a	30 min nach erstem Erhitzen ^a	15 sec na 2. Erhitze
1	-	0,23 0,36	0,00 0,03	0,23 ^b 0,22 ^b
2	0,00	0,10 0,03	0,00 0,00	0,10 ^b
3	0,00	0,33 0,19 0,22	0,00 0,00	0,03 0,03 0,06
4	0,03	0,19 0,31 0,15	0,00 0,07	0,11 0,12 0,12
5	0,00	0,13 0,13 0,15 0,13	-	0,09 ^b 0,10 ^b 0,05 ^b

Die Proben wurden erhitzt und der Aminoacylierungstest durchgeführt wie in der Legende zu Abb. 11 beschrieben.

^a Zeit des Beginns des Aminoacylierungstests

^b vor dem 2. Erhitzungsschritt war die Probe eingefroren (siehe Text).

Es zeigte sich, daß das Fragment 2 Minuten nach dem Erhitzen fast keine Akzeptoraktivität mehr hatte. In den Aminoacylierungsversuchen mit den in Kapitel 3.3.1.1. angegebenen Vorinkubationsbedingungen war noch nach 10 Minuten ein Anteil der Fragmentmoleküle mit Serin beladen. Dies ließ sich dadurch erklären, daß die Deacylierungsgeschwindigkeit langsamer als die Inaktivierungsgeschwindigkeit war.

3.3.2.

Ser 20,21-85

Ein Fragment der tRNA^{Ser} mit einer ungefähr gleichen Kettenlänge, wie das Fragment Ser 20,21-85 wurde auf seine Aminoacylierbarkeit untersucht (Ser 16?-85, Ref.49), und es zeigte sich, daß das Fragment nur in Kombination mit homologen Fragmenten unter Standardbedingungen aktiv war.

Auch das Fragment Ser 20,21-85 war nicht aminoacylierbar, wenn es unter Standardbedingungen mit Serin beladen werden sollte. Die zweiwertigen Ionen wurden nach Ref. 39,40 entfernt, das Fragment wurde 1,75 min auf 85° erhitzt; anschließend konnte es mit Serin beladen werden. Es wurden 0,2 pMol Serin / pMol Ser 20,21-85 gebunden. Die Kurven, die den Verlauf der Beladung in Abhängigkeit von der Zeit beschrieben, waren denen des Fragments Ser 36-85 sehr ähnlich. Die Deacylierungsgeschwindigkeit schien aber viel langsamer zu verlaufen. Nach 20 Minuten war der Anteil der mit Aminosäure beladenen Fragmentmoleküle in manchen Fällen ebenso hoch, wie nach drei Minuten, wo stets das Maximum an Beladung gefunden wurde. Bei manchen Aminacylierungsversuchen war das Plateau der Beladungskurve innerhalb des beobachteten Zeitraums nahezu konstant. (Abb. 12a).

Bei den meisten Versuchen war nach etwa 20 Minuten eine mehr oder weniger schnelle Abnahme des Anteils an beladenen Fragmentmolekülen zu beobachten. Durch analytische Gelelektrophorese von Proben vor und nach der Aminoacylierungssinkubation wurde überprüft, ob der Abfall der Kurve durch eine Nucleaseaktivität erklärt werden könnte. Es wurden aber keine Anzeichen eines Abbaus durch Nucleasen festgestellt.

Das Ausmaß der Beladung bei den verschiedenen Versuchen und mit verschiedenen Präparationen des Fragments Ser 20,21-85 war stets etwa gleich hoch. Ebenso wie das Fragment Ser 36-85 konnte das Fragment Ser 20,21-85 durch Zugabe einer Mg^{++} -Pufferlösung aktiviert werden. Die Endkonzentration an Mg^{++} war 2 mM. Der zeitliche Verlauf der Inaktivierung war nach Erhitzen und nach Mg^{++} -Zugabe gleich. Es wurden die selben Kurven gefunden, wie bei der Inaktivierung des Fragments Ser 36-85.

Es gelang, einen zweiten Erhitzungsschritt für eine zweite Aktivierung durchzuführen. Die Ergebnisse und die Probleme waren dieselben, wie beim Fragment Ser 36-85. (Abb. 12b). Die Aktivierung ließ sich nur dann reproduzierbar wiederholen, wenn die Lösung vor dem zweiten Erhitzen eingefroren war. Ohne Einfrieren konnte nicht in jedem Fall eine Aktivierung erreicht werden.

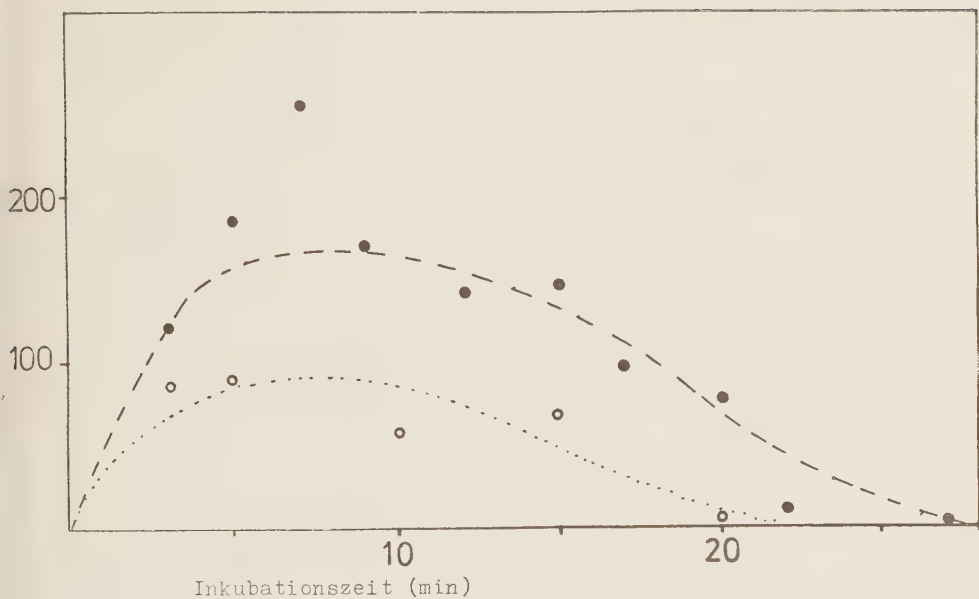


Abb. 12 b:

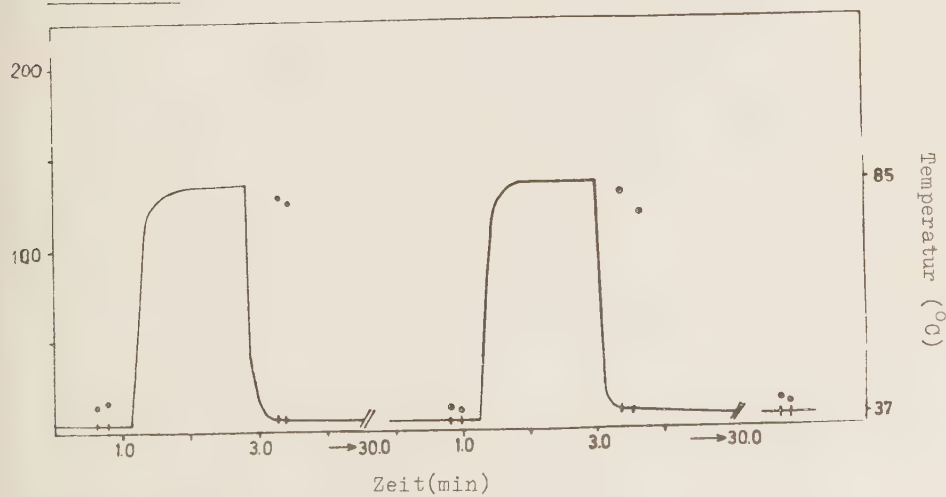


Abb. 12: Aminoacylierung von Ser 20,21-85

- a) 0,4 A_{260} -Einheiten Ser 20,21-85 wurden in 0,5 ml Puffer (1,75 mM $MgCl_2$, 5 mM Kaliumcacodylat, pH 7,0) auf 85° erhitzt und 15 sec nach dem Abkühlen mit 200 mikro-Einheiten Seryl-tRNA-Synthetase unter Standardbedingungen inkubiert. Je 0,1 ml des Gemisches wurde in Zeitabständen entnommen und mit Trichloressigsäure gefällt.

●●●● Ser 20,21-85 nach Vorinkubation

oooo Ser 20,21-85 unmittelbar nach Mg^{++} -Zugabe

- b) 0,4 A_{260} -Einheiten Ser 20,21-85 wurden in 0,5 ml Puffer (siehe 12 a) auf 37° gebracht. Zu den angegebenen Zeiten wurden 0,05 ml des Gemisches entnommen und mit 20 mikro-Einheiten 3 Minuten bei 37° unter Standardbedingungen inkubiert, anschließend wurde mit Trichloressigsäure gefällt.

———— Temperaturverlauf des Gemisches.

●●●● Ser 20,21-85, Aminoacylierung nach 3 Minuten Inkubation.

3.3.3.

Phe 36-76

tRNA^{Phe}_{Hefe} ist ebenfalls ein häufig verwendetes Modellmolekül zur Untersuchung der tRNA - Synthetase Wechselwirkung (29,33,53). Die Ergebnisse, die mit Hilfe der Fragmentmethode erhalten wurden, erlaubten die Aufstellung eines Negativkataloges, in dem solche Sequenzen aufgeführt sind, die nicht essentiell für die Synthetaseerkennung sind (53). Bei tRNA^{Phe} gehören die gesamte Anticodonregion, die hU-Schleife und die S-Region zu diesen Negativkatalog.

Das Fragment Phe 36-76 kann durch eine chemische Spaltung dargestellt werden. Unter Standardbedingungen konnte es nicht mit Phenylalanin beladen werden (53). Mit dem Fragment Phe 1-34 bildet es einen stabilen Komplex, der von der Synthetase erkannt und beladen wird. Das Fragment Phe 36-76 bildet auch mit dem Fragment Ser 1-34 einen stabilen Komplex, der aber weder von der Seryl-tRNA-Synthetase, noch von der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase beladen werden kann (30). Diese Komplexbildung ließ auf eine gewisse strukturelle Verwandtschaft zwischen den Fragmenten Ser 36-85 und Phe 36-76 schließen. Daher wurde versucht, das Fragment Phe 36-76 zu aktivieren, indem ähnliche Bedingungen wie zur Aminoacylierung von Ser 36-85 angewendet wurden.

Das Fragment Phe 36-76 wurde Mg^{++} -frei dialysiert. Es wurde 1,75 Minuten in 1,75 mM Mg^{++} , 0,05 M Cacodylat pH 7,0 auf 65° erhitzt. Nach Abkühlen auf 37° konnte es aminoacyliert werden.

Das Ausmaß der Beladung war nicht nur bei verschiedenen Versuchen verschieden hoch, sondern auch innerhalb eines Versuchs bei verschiedenen Proben. Eine Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden. Daher wurde versucht, durch eine große Anzahl von Experimenten bei gleichbleibenden Bedingungen einen Anhaltspunkt für etwaige Gesetzmäßigkeiten dieser Streuung zu finden. Die in Abbildung 13 zusammengefaßten Werte setzen sich aus 10 voneinander unabhängigen Einzelversuchen zusammen. Im Bereich bis zu 10 Minuten waren fast alle Einbauwerte positiv. In Proben, die nach 10 Minuten Inkubation entnommen worden waren, konnten nur noch selten mit Aminosäure beladene Fragmentmoleküle nachgewiesen werden. Dies ließ auf ein ähnliches Verhalten des Fragments Phe 36-76 wie das Fragment Ser 36-85 schließen. Der Unterschied bestand nur aus der starken Streuung der Einbauwerte des Fragments Phe 36-76.

Ebenso starke Streuungen innerhalb eines einzelnen Versuchs wurden in den Versuchsreihen von C. Lossow gefunden (43). Es handelt sich dabei um Versuche, CCA-Hälften der $tRNA_{E.coli}^{Val_1}$ und der $tRNA_{Hefe}^{Ala_1}$ mit der oben genannten Erhitzungsmethode zu aktivieren. Auch in diesen Fällen wurde eine mehr oder minder hohe Akzeptoraktivität gefunden. Die Streuungen innerhalb eines Versuchs waren beträchtlich. Ohne Aktivierung durch Erhitzen konnte keine Akzeptoraktivität gefunden werden. Der Grund für die Streuung war auch hier unklar.

INCUBATIONSZEIT (min)

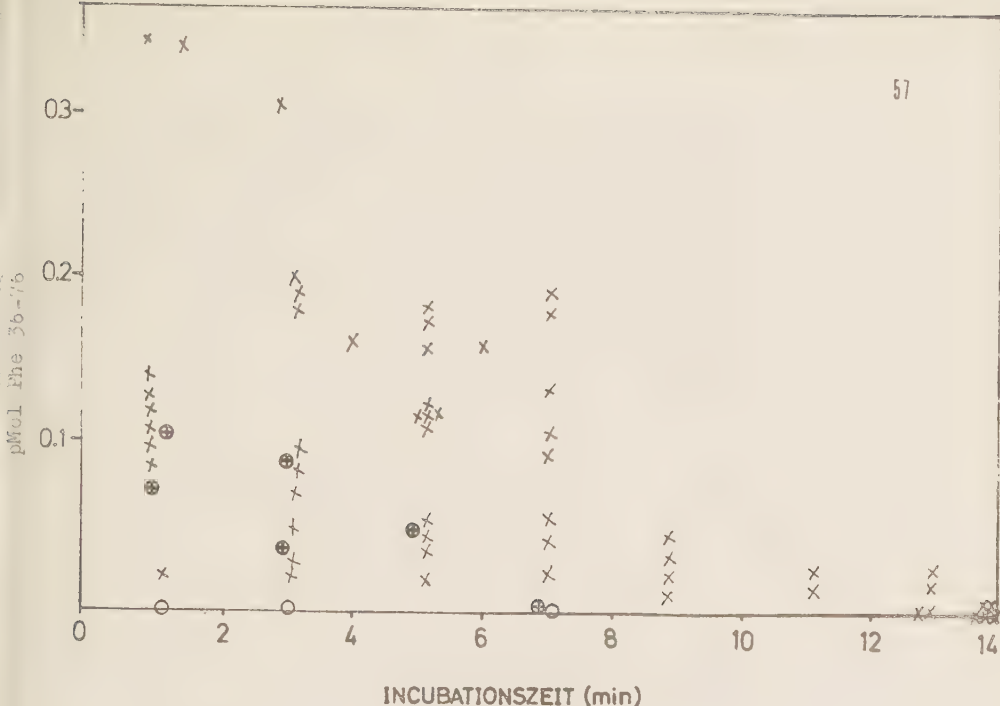


Abb. 13: Akzeptoraktivität des Fragments Phe 36-76

0,3 A_{260} -Einheiten Phe 36-76 wurden in 0,5 ml Puffer (1,75 mM $MgCl_2$, 5 mM Kaliumcacodylat, pH 7,0) für 1,75 Minuten auf 65° erhitzt und 15 sec nach dem Abkühlen mit 0,3 mE Phenylalanyl-tRNA-Synthetase unter Standardbedingungen inkubiert, je 0,1 ml des Gemisches wurden in Zeitabständen entnommen und mit Trichloressigsäure gefällt. Die Ergebnisse von 10 voneinander unabhängigen Experimenten wurden in die Graphik eingetragen. Parallel dazu wurden nicht erhitzte und durch Mg^{++} -Zugabe aktivierte Fragmentlösungen getestet.

xxxx Phe 36-76 erhitzt

••••• Phe 36-76 nach Mg^{++} -Zugabeoooo Phe 36-76 30 Minuten nach Mg^{++} -Zugabe, nicht erhitzt

Es wurden Aminoacylierungsversuche unternommen, nachdem das Fragment Phe 36-76 durch Zugabe von Mg^{++} aktiviert worden war. Die Bedingungen und die Ergebnisse waren die gleichen, wie für das Fragment Ser 36-85 im Kap. 3.3.1.2. beschrieben mit dem Unterschied, daß die Aminoacylierung mit dem Fragment Phe 36-76 größere Streuungen innerhalb der einzelnen Tests zeigte. (siehe Abb.13) Die Untersuchungen der Inaktivierung nach dem Aktivierungsschritt durch Erhitzen brachten dieselben Resultate, wie für das Fragment Ser 36-85 im Kap. 3.3.1.3. beschrieben. Die zweite Aktivierung durch ein zweites Erhitzen gelang unter denselben Voraussetzungen wie beim Fragment Ser 36-85.

3.3.4.

Versuche zur Fehlbeladung von Fragmenten

Die Fragmente Ser 36-85 und Phe 36-76 verhielten sich im Aminoacylierungstest sehr ähnlich. Es stellte sich die Frage, ob die beiden Fragmente nach der Aktivierung spezifisch erkannt werden oder ob die Synthetase die beiden Fragmente verwechseln kann. Genügt die Information der Nucleinsäurekette der CCA-Hälfte, damit die Synthetase die richtige von der falschen tRNA unterscheiden kann? Von Dudock et al. (26) werden verschiedene Klassen von Erkennungsregionen beschrieben. Danach bestünde die Möglichkeit, daß die Information der CCA-Hälfte nur für die Erkennung der tRNA und nicht für die Spezifität sorgt.

Nach dem Erhitzen zur Aktivierung wurde das Fragment Ser 36-85 mit dem Aminoacylierungsgemisch für eine Phenylalaninbeladung inkubiert, das Fragment Phe 36-76 mit dem Gemisch zur Serinbeladung.

In beiden Fällen konnte keine Aktivität festgestellt werden, wohingegen die beiden Fragmente im Parallelversuch in ihrem kompetenten Aminoacylierungsgemisch mit der richtigen Aminosäure beladen werden konnten. Damit war bewiesen, daß die Synthetase unter den Versuchsbedingungen nur das richtige Fragment erkennen konnte. Außerdem dienten diese Versuche zur Kontrolle der Aminoacylierungen beider Fragmente; sie wurden 3 Mal wiederholt.

3.4.

Aminoacylierung von Fragmentkombinationen

Unter Standardtestbedingungen zeigten die Fragmente Ser 36-85, Ser 1-34, Ser 20,21-85, Ser 1-15,18 und Ser 1,2-30 keine Akzeptoraktivität. Eine Ausnahme waren nur bestimmte Präparationen des Fragments Ser 36-85 (30).

Sämtliche möglichen Kombinationen, die einen komplementären Komplex bilden können, wurden erstens auf ihre Akzeptoraktivität getestet und zweitens in einer analytischen Gelelektrophorese unter nicht-dissoziierenden Bedingungen untersucht. Wie erwartet, konnten komplementäre Fragmente als Komplex beladen werden.

Die Aminoacylierung der Fragmentkombination Ser 36-85 + Ser 1-34 wurde bereits beschrieben (30). Auch das Fragment Ser 20,21-85 konnte in Gegenwart des Fragments Ser 1-15,18 mit Serin beladen werden. Das Ausmaß der Beladung hing aber sehr stark von der Menge des Fragments Ser 1-15,18 ab, die zugesetzt wurde. Bei einem 40fachen molaren Überschuß des Fragments Ser 1-15,18 wurden 0,22 pMol Serin / pMol Ser 20,21-85 eingebaut.

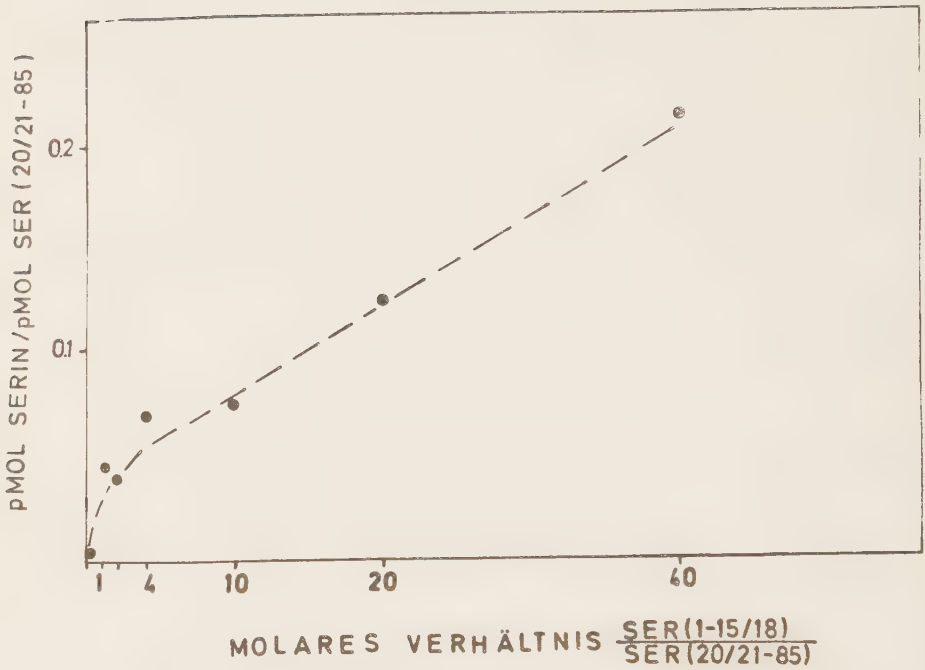


Abb. 14: Aminoacylierung von Ser 20,21-85 in Abhängigkeit von zugesetztem Ser 1-15,18. 0,04 A_{260} -Einheiten Ser 20,21-85 wurden unter Standardbedingungen mit den angegebenen Mengen an Ser 1-15,18 und 30 mikroeinheiten Seryl-tRNA-Synthetase inkubiert (20 min bei 20°).

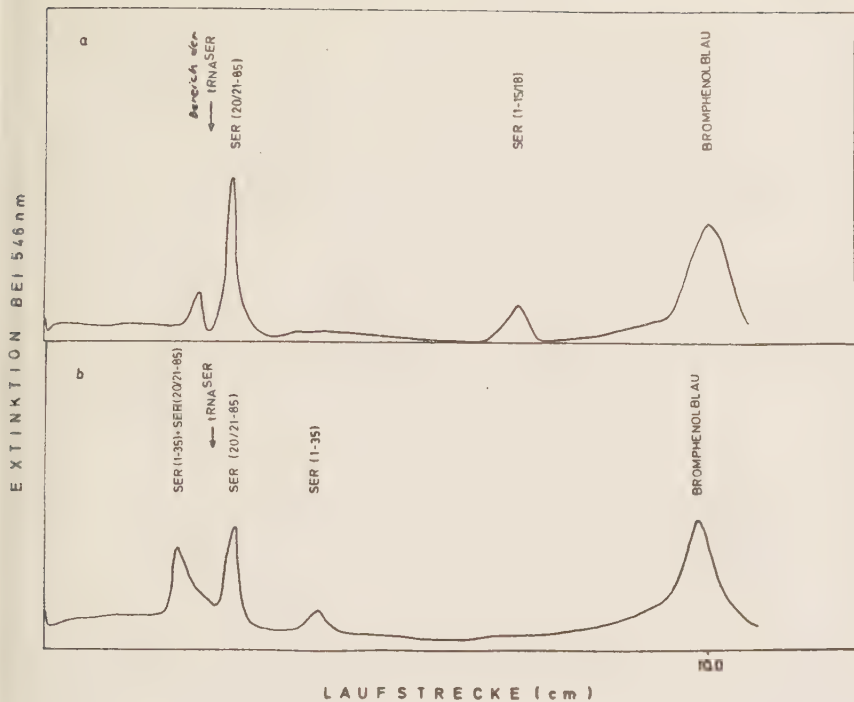


Abb. 15: Densitogramm einer analytischen Gelelektrophorese unter nicht dissoziierenden Bedingungen.

a) 1 : 1 -Gemisch der Fragmente Ser 1-15,18 und Ser 20,21-85

b) 1 : 1 -Gemisch der Fragmente Ser 1-34 und Ser 20,21-85.

Die Ursache für die unvollständige Aminoacylierung des Fragmentgemisches war der geringe Assoziationsgrad beider Fragmente miteinander. Das wurde durch Gelelektrophorese unter nicht-dissoziierenden Bedingungen bewiesen. Im Fragmentgemisch Ser 20,21-85 : Ser 1-15,18 = 1 : 1 lagen maximal 10 % der Fragmente als Komplex vor. Unter gleichen Bedingungen assoziierte das Fragment Ser 20,21-85 sehr viel besser mit dem Fragment Ser 1-34. In einem Gemisch Ser 20,21-85 : Ser 1-34 = 1 : 1 waren nach Analyse durch Gelelektrophorese etwa 50 % der Moleküle assoziiert. Mit diesem Befund stimmte überein, daß in diesem Gemisch das Fragment Ser 20,21-85 zu etwa 60 % aminoacyliert wurde. Das Fragment Ser 1,2-30 zeigte eine unerwartet geringe Neigung, Komplexe zu bilden. In analytischer Gelelektrophorese unter nicht-dissoziierenden Bedingungen konnten weder in der 1 : 1 Kombination mit dem Fragment Ser 36-85 noch in der Kombination mit dem Fragment Ser 20,21-85 eine Komplexbildung beobachtet werden. Diese beiden Fragmente zeigten in Kombination mit dem Fragment Ser 1,2-30 keine signifikant hohe Akzeptoraktivität im Aminoacylierungstest. Als Grund dafür wurde eine stabile intramolekulare Basenpaarung angenommen. Intramolekulare Basenpaarung wird auch bei manchen anderen Fragmenten beobachtet (42,43).

4.

Diskussion

Um das Strukturelement zu finden, welches an der Erkennung der tRNA durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase beteiligt ist, wurde als Modellmolekül die tRNA^{Ser}_{Hefe} und als Methode die Aminoacylierung von Fragmenten dieser tRNA gewählt. Dazu war es notwendig, die tRNA^{Ser} an bestimmten Stellen spezifisch zu spalten. Es wurden chemische und enzymatische Spaltungen angewendet.

Die chemische Modifizierung der Dihydrouridin-Reste beeinträchtigt die Akzeptoraktivität der tRNA^{Ser} nicht. So konnte erhofft werden, daß Fragmente, die durch Spaltung an den Positionen der hU entstehen, entweder allein oder in Kombination mit anderen Fragmenten aminoacylierbar sind. Eine chemische Spaltung an der Position der hU wurde erstmals an der tRNA^{Phe} durchgeführt. Die entstehenden Spaltprodukte wurden nicht isoliert oder näher charakterisiert (35). Die Spaltungsbedingungen wurden modifiziert und im präparativen Maßstab an der tRNA^{Ser} angewendet. Die Oligonucleotidanalyse der Spaltprodukte bestätigte, daß die tRNA^{Ser} tatsächlich in der hU-Schleife gespalten worden war. Man kann annehmen, daß dieses Verfahren allgemein zur Spaltung von tRNAs geeignet ist, da die meisten tRNA-Moleküle ein oder mehrere hU-Nucleotide enthalten. Die Isolierung der durch diese Spaltung entstehenden Fragmente könnte bei der Aufklärung einer tRNA-Sequenz eine wichtige Hilfe leisten.

Wie bei Proteinen kann man bei tRNAs einen Zusammenhang zwischen nativer Konformation, biologischer Aktivität und Widerstandsfähigkeit gegenüber abbauenden Enzymen feststellen. Dieser Zusammenhang konnte auch bei den Versuchen mit tRNA^{Ser} gefunden werden.

Das native und biologisch aktive Molekül wird bevorzugt im Anticodon und beim CCA-Ende gespalten (30). Diese beiden Stellen sind also exponiert. Der Rest des Moleküls ist gegenüber einem Abbau durch Nucleasen verhältnismäßig stabil. Er besteht im Wesentlichen aus doppelsträngigen Bereichen. Aus den Messungen von Danchin und Guéron war bekannt, daß diese Regionen durch zweiwertige Kationen stabilisiert werden (55). Durch den Entzug der Mg^{++} -Ionen entstand eine denaturierte Form, die biologisch inaktiv war und eine zusätzliche Spaltstelle im Doppelstrangbereich aufwies (39). Immerhin war das denaturierte tRNA^{Ser}-Molekül gegenüber einem weiteren Abbau durch die T1-RNase noch so stabil, daß andere Bereiche geschützt waren, darunter sogar Bereiche, die in nativer tRNA^{Ser} exponiert sind (3'-Ende). Wenn das tRNA-Molekül vollkommen geschmolzen ist, gibt es keine präferentiellen Spaltstellen mehr; daher war die Suche nach neuen Spaltstellen eigentlich eine Suche nach einer anderen Konformation als native und völlig geschmolzene tRNA^{Ser} (und die bereits beschriebene Mg^{++} -frei dialysierte denaturierte Form). Es wurden Spaltungsversuche der tRNA^{Ser} unter sehr vielen verschiedenen Bedingungen unternommen. Die dabei neu aufgetretenen Fragmente lagen immer nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Dies ließ vermuten, daß andere Konformationen zu einem kleinem Prozentsatz oder nur kurzzeitig entstanden.

Zur Charakterisierung der Konformation von tRNAs kann also die Methode der enzymatischen Partialspaltung herangezogen werden. Dies geschieht aber unter der Voraussetzung, daß nur die Tertiärstruktur der tRNA für die Ausbildung präferentieller Spaltstellen verantwortlich ist. Hätten die RNasen "subsites", die zu bestimmten Stellen der tRNAs eine höhere Affinität bewirken, wäre die Ausbildung präferentieller Spaltstellen vom Enzym abhängig.

Im zweiten Teil der zur Diskussion stehenden Arbeit wurden die Aminoacylierungsversuche von Fragmenten und Fragmentkombinationen beschrieben. Mit Ausnahme der CCA-Hälfte der tRNA^{Ser} wurde noch von keinem Fragment berichtet, das ohne Komplexbildung mit einem anderen Fragment aminoacyliert werden konnte. Zumindest der Akzeptorstamm sollte unversehrt sein, um eine erfolgreiche Aminoacylierung durchführen zu können (25).

Aber auch das Fragment Ser 36-85 konnte nicht reproduzierbar aminoacyliert werden (30). Bei einigen Aufarbeitungen konnten bis zu 40 % der Moleküle aminoacyliert werden, bei einigen anderen war das Fragment völlig inaktiv. Die Ursache dafür war nicht klar. (Kap. 3.3.1.) Wenn das Mg^{++} -frei dialysierte Fragment durch Zugabe von geringen Mengen Mg^{++} oder durch Erhitzen in diesem Puffer aktiviert worden war, gelang die Aminoacylierung reproduzierbar. Ob die aktive Konformation bereits nach Mg^{++} -Zugabe oder nach dem Erhitzen vorlag, oder ob die aktive Konformation erst durch Zugabe der Substanzen zur Aminoacylierung gebildet wurde, ließ sich mit diesen Versuchen nicht klären. Die Umwandlung der aktiven in die inaktive Konformation verlief

jedenfalls relativ langsam verglichen zur Aminoacylierungsgeschwindigkeit; die Umwandlungsgeschwindigkeit wurde durch die höhere Mg^{++} -Konzentration des Aminoacylierungspuffers nicht so verändert, daß die Akzeptoraktivität nicht mehr meßbar wurde.

Der zeitliche Verlauf der Aminoacylierung wurde beobachtet. Nach etwa 10 Minuten wurde bei allen Versuchen eine rasche Abnahme des Anteils beladener Fragmentmoleküle festgestellt. Dafür wäre folgende Interpretation möglich: Nach der Vorbehandlung wurde das Fragment in der biologisch aktiven Form beladen. Diese Konformation war aber nicht stabil, und während der Inkubation zur Aminoacylierung wandelte sich das beladene und das unbeladene Fragment in eine biologisch inaktive Konformation um. Das bereits beladene Fragment wurde dann entweder chemisch oder enzymatisch deacyliert, wodurch der Anteil beladener Fragmente zurückging. Eine enzymatische Deacylierung war hier durchaus möglich, da die Aminoacylierung eine Gleichgewichtsreaktion ist. Durch die Umwandlung der CCA-Hälfte in die biologisch inaktive Konformation nahm die Konzentration an aminoacylierbaren Fragmentmolekülen ab, und das bereits beladene Fragment wurde entsprechend der neuen Lage des Gleichgewichts deacyliert. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, daß das in der inaktiven Konformation vorliegende Fragment von der Synthetase als "falschbeladen" erkannt und deshalb deacyliert wurde (56,57).

Sowohl die CCA-Hälfte der $tRNA^{Ser}$, als auch die CCA-Hälfte der $tRNA^{Phe}$ ließen sich aminoacylieren. Daher war es besonders

interessant zu untersuchen, ob das aktivierte Fragment auch spezifisch von der richtigen Synthetase erkannt wurde. Unter den hier angewendeten Bedingungen konnte die Seryl-tRNA-Synthetase nur das Fragment Ser 36-85 und die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase nur das Fragment Phe 36-76 mit Aminosäure beladen. Dieser Versuch war nicht nur eine gute Kontrolle der Aminoacylierungstests, sondern auch ein wichtiger Hinweis auf die Bedeutung der richtigen Sequenz für die Erkennung durch die Synthetase.

Ob auch in der intakten tRNA nur die 3'-terminale Hälfte des tRNA-Moleküls von der Synthetase erkannt wird und die 5'-terminale Hälfte nur dazu dient, die CCA-Hälfte zu stabilisieren, ist mit diesen Versuchen nicht zwingend bewiesen. Auch ob sich die Ergebnisse mit den Fragmenten der tRNA^{Ser} und der tRNA^{Phe} auf andere tRNAs übertragen lassen, ist nicht erwiesen. Aus dem Vergleich mit Ergebnissen, die mit anderen tRNAs erhalten worden sind (vgl.: tRNA^{Ala}_{Hefe}, Ref. 25) kann man schließen, daß es eine bei allen tRNAs gemeinsame Region zur Erkennung durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase nicht gibt.

5.

Experimenteller Teil

5.1.

Chemische Spaltungen

Die Spaltungen an den Positionen der hU wurden wie folgt durchgeführt: Die hU-Reste wurden nach Ref. 34 reduziert. 380 A₂₆₀-Einheiten reduzierter tRNA^{Ser} wurden in 10 ml 10 M Harnstofflösung, pH 2,2 gelöst und drei Stunden bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 %iger Kaliumacetatlösung gestoppt. Die tRNA wurde durch Äthanol gefällt. Eine Suspension von 0,42 ml Anilin in etwa 5 ml Wasser wurde mit HCl auf pH 5 gebracht. Darin wurde die tRNA gelöst und die Lösung wurde auf 10 ml aufgefüllt. Nach zwei Stunden bei Zimmertemperatur und unter Lichtabschluß wurde ein Teil des Anilins durch Ätherextraktion entfernt und die RNA durch Äthanol-fällung aus dem Reaktionsgemisch gewonnen.

5.2.

Disc. Gelelektrophorese

Sowohl die analytischen, als auch die präparativen Gelelektrophoresen wurden, falls im Text der Ergebnisse nicht anders erwähnt, nach den Methoden von Philippsen et al. (36,49) durchgeführt.

Für die Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde das System von R. Thiebe verwendet (53):

In einem Liter einer 5 mM Diäthylbarbitursäurelösung wurden 3,3 mMol Magnesiumpulver gelöst (pH= 7,3). Das Trenngel enthielt 12% Acrylamid, 0,35 % Bisacrylamid, 4,5 mM $MgCl_2$, 40 mM Imidazol (mit HCl auf pH = 5,8 eingestellt) ; Tetramethyl-äthylendiamin und Ammoniumpersulfat waren wie beim Trenngel. Die Laufzeit des Gels betrug etwa drei Stunden bei 4° und 250 Volt.

Die Elutionsmethode der Fragmente aus einer präparativen Elektrophorese wurde im Kap. 3.1.1. beschrieben.

5.3.

Oligonucleotidanalyse

T1-RNase Totalspaltung: Wenn im Kapitel Ergebnisse nicht anders beschrieben, wurden 6-20 A_{260} -Einheiten $tRNA^{Ser}$ oder ein $tRNA^{Ser}$ -Fragment in 1 ml Wasser mit 250 Einheiten T1-RNase im Autotitrator bei pH 7,5 und 45° gespalten. Die Aufnahme von 0,01 M NaOH wurde automatisch registriert und die Inkubation etwa eine Stunde nach der letzten Zugabe von Lauge beendet.

Säulenchromatographie der Oligonucleotide: Nach der Totalspaltung wurde Harnstoff zugesetzt (ad 7M, pH 7,5). Die Trennung erfolgte auf einer DEAE-Cellulose Säule (0,3 x 70 cm) mit einem linearen Gradienten: 0,01 - 0,3 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl pH 7,5, 7 M Harnstoff. (je 250 ml). Fraktionsgröße: 1 ml. Die Nucleotide wurden nach Ref. 59 isoliert.

§.4.

tRNA, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Aminacylierungstests

Unfraktionierte tRNA aus Hefe wurde von der Firma Boehringer, Mannheim GmbH bezogen. tRNA^{Ser} wurde entweder von Herrn H.G. Zachau freundlicherweise zur Verfügung gestellt oder aus einer vorfraktionierten Charge (160 pMol Serin / A₂₆₀-Einheit tRNA) durch Gegenstromverteilung im Tri-n-butylamin-System (6) und Chromatographie auf benzoylierter DEAE-Cellulose Säule bei pH 3,0 nach Ref. 11 gewonnen. Die Akzeptoraktivität der tRNA^{Ser} betrug zwischen 1100 und 1350 pMol Serin / A₂₆₀-Einheit tRNA. tRNA^{Phe} wurde von Herrn W. Wintermeyer, Fragmente der tRNA^{Phe} von Herrn R. Thiebe zur Verfügung gestellt. Das Fragment Phe 36-76 wurde nach R. Thiebe et al. (33) dargestellt.

Gereinigte Seryl-tRNA-Synthetase und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase wurden freundlicherweise von Herrn R. Hirsch zur Verfügung gestellt. Die Synthetaseaktivität betrug 18 mEinheiten / A₂₈₀-Einheit Proteinlösung für die Seryl-tRNA-Synthetase und 50 mEinheiten / mg Protein für die Phenylalanin-tRNA-Synthetase (60).

Die Aminosäureakzeptoraktivität wurde, wenn nicht anders angegeben, wie in Ref. 61 getestet.

5.5.

Apparative Hilfsmittel.

Absorptionsmessungen: Spektralphotometer PMQ II und PL 4 der Fa. Zeiss und ein registrierendes Spektralphotometer Cary 15 (Varian Ass.)

Szintillationsmessungen: Tri-Carb- Modelle 3310 und 3375 (Packard Instruments)

Disc.-Elektrophorese: Umgebaute Elektrophorese-Kammer EC 490 (EC Apparatus Corp.)

pH-Messungen: pH-Meter und Autotitrator der Fa. Radiometer, Kopenhagen.

Zerkleinerung der Gelstücke: Ultra Turrax TP 18/2 (Jahnke und Kunkel, Staufen).

Temperaturveränderung bei der Vorinkubation: Zwei Thermostaten waren in zwei Wasserbädern auf die verschiedenen Temperaturen eingestellt. Zwei Pumpen waren mit dem Mantelgefäß zur Vorinkubation derart verbunden, daß wahlweise nur ein Wasserbad das Mantelgefäß durchfluten konnte. Das Inkubationsgefäß war aus sehr dünnwandigem Glas. Die Geschwindigkeit der Temperaturänderung im Inkubationsgefäß wurde mit Thermoelementen überwacht.

5.6.

Sonstige Materialien

Alle Reagentien stammen von der Fa. Merck, Darmstadt oder von der Fa. Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg. Radioaktive Materialien wurden von der Firma The Radiochemical Centre, Amersham, England bezogen.

6.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit werden chemische und enzymatische Methoden zur Spaltung der tRNA^{Ser} beschrieben.

Eine chemische Spaltung gelang nach Reduktion der Dihydrouridinreste mit NaBH₄, aminkatalysierter β -Eliminierung und anschließender Säurebehandlung. Zwei Fragmente der tRNA^{Ser} wurden gewonnen: Ser 1-15,18 und Ser 20,21-85. Die Primärstruktur dieser Fragmente wurde durch Oligonucleotidanalyse sichergestellt.

Bei enzymatischen Spaltungen durch die T1-RNase war das Anticodon der tRNA^{Ser} die bevorzugte Spaltstelle. Trotz vieler Versuche unter verschiedenen Bedingungen und mit verschiedenen Nucleasen gelang es nicht, eine präferentielle Spaltstelle zu finden, die die Darstellung anderer Fragmente in genügender Ausbeute ermöglicht hätte. Statt tRNA^{Ser} wurden deshalb Fragmente der tRNA mit spezifischen Endonucleasen gespalten oder mit Exonucleasen abgebaut. Auf diese Weise wurden insgesamt 10 verschiedene Fragmente dargestellt und isoliert. Die Primärstruktur der Fragmente Ser 36-82 und Ser 1,2-30 wurde durch Oligonucleotidanalyse bestimmt.

Bei dem Vergleich der Spaltungen durch die T1-RNase mit den Spaltungen durch die N1-RNase wurde gefunden, daß die Ursache zur Ausbildung präferentieller Spaltstellen hauptsächlich in der

Raumstruktur der tRNA und nicht in der Affinität des Enzyms zu bestimmten Sequenzen liegt.

Im zweiten Teil der Arbeit werden Untersuchungen über die Aminoacylierbarkeit von Fragmenten und Fragmentkombinationen beschrieben. Die Kombinationen der Fragmente Ser 36-85 und Ser 20,21-85 mit den Fragmenten Ser 1-34, Ser 1-15,18 und Ser 1,2-30 waren im Aminoacylierungstest umso aktiver, je höher das Ausmaß der Komplexbildung war. Die Fragmente allein waren unter Standardtestbedingungen inaktiv. Durch kurzzeitiges Erhitzen auf 85° in 2 mM Mg^{++} konnte das Fragment Ser 20,21-85 in eine aminoacylierbare Form gebracht werden. Unmittelbar nach dem Erhitzen konnte das Fragment mit Serin beladen werden, obwohl ein Viertel des $tRNA^{Ser}$ -Moleküls abgespalten worden war. Auch das Fragment Ser 36-85, dem sogar die Hälfte der $tRNA^{Ser}$ -Sequenz fehlte, konnte durch eine Vorinkubation in eine aminoacylierbare Form gebracht werden. Demnach enthält die CCA-Hälfte die zur Synthetaseerkennung notwendige Information. Die aktive Konformation lagerte sich innerhalb weniger Minuten wieder in eine inaktive Form um. Durch einen zweiten Erhitzungsschritt konnten die Fragmente wieder aktiviert werden. Unter analogen Vorinkubationsbedingungen konnte auch die CCA-Hälfte der $tRNA^{Phe}$ in eine Form gebracht werden, die im Aminoacylierungstest aktiv war. Die Aminoacylierungsversuche an den tRNA-Fragmenten bestätigten, daß für die Synthetaseerkennung außer der Nucleotidsequenz die richtige Konformation der Nucleinsäurekette erforderlich ist. Darüberhinaus wurde bewiesen, daß bei $tRNA^{Ser}$ und $tRNA^{Phe}$ die Strukturelemente der CCA-Hälften zur Synthetaseerkennung und für eine erfolgreiche Aminoacylierung ausreichen.

7.

Literaturverzeichnis

- 1 The Mechanism of Protein Synthesis; 34. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1969)
- 2 Geiduschek, E.P. und Haselkorn, R.; Ann. Rev. Biochem. (1969) 38, 647-676
- 3 Lengyel, P. und Söll, D.; Bact. Rev. (1969) 33, 264-279
- 4 Lucas-Lenard, J. und Lipmann, F.; Ann. Rev. Biochem. (1971) 40, 409-448
- 5 Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R., Zamir, A.; Science (1965) 147, 1462-1465
- 6 Zachau, H.G., Dütting, D., Feldmann, F., Melchers, F., Karau, W.; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, (1966) 417-424
- 7 Zachau, H.G.; Angew. Chemie (1969) 81, 645-662
- 8 Holley, R.W. und Merrill, S.H.; J. Amer. Chem. Soc. (1959) 81, 753-761
- 9 Zachau, H.G., Tada, M., Lawson, W.B., Schweiger, M.; Biochim. Biophys. Acta (1961) 53, 221-223
- 10 Gillam, I., Millward, S., Blew, D., von Tigerstrom, M., Wimmer, E., Tener, G.M.; Biochemistry (1967) 6, 3043-3056
- 11 Fittler, F., Kruppa, J., Zachau, H.G.; Biochim. Biophys. Acta (1972) 277, 513-522
- 12 Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sneden, D., Kim, J.J., Kim, S.H.; Nature (1974) 248, 20-24

- 13 Philipps, G.R.; Nature (1969) 223, 374-377
- 14 Cramer, F.; Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular
Biology (1971) 11, 391-398
- 15 Sanger, F., Brownlee, G.G., Barrell, B.G.; J. Mol. Biol.
(1965) 13, 373-398
- 16 Tidwell, T.; J. Cell Biol. (1970) 46, 370-378
- 17 Chen, C-M., Hall, R.H.; Phytochemistry (1969) 8, 1687
- 18 Fittler, F., Hall, R.H.; Biochem. Biophys. Res. Commun.
(1968) 25, 441-446
- 19 Overath, H., Fittler, F., Harbers, K., Thiebe, R.,
Zachau, H.G.; FEBS Lett. (1970) 11, 289-294
- 20 Lipmann, F.; Science (1969) 164, 1024-1031
- 21 Guthrie, C., Nomura, M.; Nature (1968) 219, 232-235
- 22 Loftfield, R.B., Hecht, L.I., Eigner, E.A.;
Biochim. Biophys. Acta (1963) 72, 383-387
- 23 Chapeville, F., Lipmann, F., von Ehrenstein, G.,
Weisblum, B., Ray jr., W.J., Benzer, S.; Proc. Nat.
Acad. Sci. USA (1962) 48, 1086-1092
- 24 Yarus, M.; Ann. Rev. Biochemistry (1969) 38, 841-880
- 25 Chambers, R.W.; Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular
Biology (1971) 11, 489-501
- 26 Dudock, B., DiPerie, C., Scileppi, K., Reszelbach, R.;
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1971) 68, 681-684
- 27 Penswick, J.R.; Thesis, Ithaca, N.Y. (1966)
- 28 Bayev, A.A., Fodor, I., Mirzabekov, A.D., Axelrod, V.D.,
Kazarinava, L.Y.; Molekularnaja Biologija, engl. ed. (1967)
1, 714-723

- 29 Harbers, K., Thiebe, R., Zachau, H.G.; Eur. J. Biochem.
(1972) 26, 132-143
- 30 Fittler, F., Zachau, H.G.; Arch. Biochem. Biophys.
(1973) 155, 368-380
- 31 Rajbhandary, U.L., Chang, S.H., Stuart, A., Faulkner, R.D.
Hoskinson, R.M., Khorana, H.G.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA
(1966) 57, 751-758
- 32 Dütting, D., Feldmann, H., Zachau, H.G.; Hoppe-Seyler's
Z. für Physiol. Chemie (1966) 347, 249-267
- 33 Thiebe, R., Zachau, H.G.; Eur. J. Biochem. (1968)
5, 546-555
- 34 Igo-Kemenes, T., Zachau, H.G.; Eur. J. Biochem. (1969)
10, 549-556
- 35 Beltshev, B., Grunberg-Manago, M.; FEBS Lett. (1970)
12, 24-26
- 36 Philippsen, P., Thiebe, R., Wintermeyer, W., Zachau, H.G.;
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1968) 922-927
- 37 Philippsen, P., Zachau, H.G.; FEBS Lett. (1971)
15, 69-74
- 38 Ofengand, J.; J. Biol. Chem. (1967) 242, 5034-5045
- 39 Streeck, R.E., Zachau, H.G.; FEBS Lett. (1971) 13, 329-
334
- 40 Streeck, R.E., Zachau, H.G.; Europ. J. Biochem. (1972)
30, 382-391
- 41 Bittman, R.; J. Mol. Biol. (1969) 46, 251-268
- 42 Harada, F., Kimura, F., Nishimura, S.; Biochemistry
(1971) 10, 3277-3283
- 43 Lossow, C.; Doktorarbeit München 1975
- 44 Takai, N., Uchida, T., Egami, F.; Biochim. Biophys. Acta
(1966) 128, 218-220

- 45 Takagi, Y., Horecker, B.L. ; J. Biol. Chem. (1957)
225, 77-86
- 46 Pinder, J.C., Gratzner, W.B.; Biochemistry (1970) 9,
4519-4524
- 47 Bernardi, A., Bernardi, G.; Biochim. Biophys. Acta (1968)
155, 360-377
- 48 Razzel, W.E.; Methods in Enzymology (1963) 6, 236-258
- 49 Philippsen, P., Zachau, H.G.; Biochim. Biophys. Acta
(1972) 277, 523-538
- 50 Petrova, M., Philippsen, P., Zachau, H.G.; Biochim.
Biophys. Acta (1975), eingereicht zur Veröffentlichung
- 51 Adams, A., Zachau, H.G.; Eur. J. Biochem. (1968)
5, 556-558
- 52 Zachau, H.G.; Eur. J. Biochem. (1968) 5, 559-561
- 53 Thiebe, R., Harbers, K., Zachau, H.G.; Eur. J. Biochem.
(1972) 26, 144-152
- 54 Zachau, H.G.; Nova Acta Leopoldina (1970) 194, 155-174
- 55 Danchin, A., Guéron, M.; Eur J. Biochem. (1970)
16, 532-536
- 56 Bonnet, J., Ebel, J.P.; Eur. J. Biochem. (1970) 31, 335-
344
- 57 Yarus, M.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1972) 69, 1915-1919
- 58 Eur. J. Biochem. (1970) 15, 203-208
- 59 Danek, K., Weimann, G., Cramer, F.; Experientia (1965)
21, 417-424
- 60 Rigler, R., Cronvall, E., Hirsch, R., Pachmann, U.,
Zachau, H.G.; FEBS Lett. (1970) 11, 320-323
- 61 Zachau, H.G.; Bergmeyer, H.U., Methoden der Enzymatischen
Analyse, Verlag Chemie Weinheim, 2. Auflage (1970) 1828-
1834

Abkürzungen

A_{260}	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke
CCA-Hälfte	3'-terminales Halbmolekül einer tRNA
DEAE-Cellulose	Diäthylaminoäthyl-Cellulose
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
hU	Dihydrouridin
hU'	mit NaBH_4 reduziertes hU
Milz-PDE	Exonuclease aus Schweinemilz
N1-RNase	Endonuclease aus <i>Neurospora crassa</i>
pG-Hälfte	5'-terminales Halbmolekül einer tRNA
R_{BB} -Wert	Quotient der Wanderungsgeschwindigkeiten in Gelelektrophorese von Nucleinsäure und Bromphenolblau
PDE	Phosphodiesterase
PME	Phosphomonoesterase
Ser 36-76	Nucleinsäure mit der Primärstruktur der tRNA ^{Ser} von Nucleotid 36 bis zum Nucleotid 76
Ser 36-76?	wie oben; die Zuordnung zu 76 ist nicht sichergestellt
Ser ?	Fragment der tRNA ^{Ser} mit unbekannter Primärstruktur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T1-RNase	Endonuclease aus <i>Takadiastase</i>
tRNA ^{Ser} _{ox}	am 3'-Terminus oxydierte tRNA ^{Ser}

Die Abkürzungen für Nucleinsäuren etc. folgen den Regeln der IUPAC-IUB (58).

Lebenslauf

Als einziger Sohn des im Kriege gefallenen Kaufmanns Hermann Josef Wübbeler und seiner Ehefrau Angela wurde ich am 5. 10. 1945 in Graz, Österreich, geboren. Hier besuchte ich die Volksschule und das II. Bundesrealgymnasium. Nach dem Abitur 1963 studierte ich Technische Chemie an der Technischen Hochschule in Graz; 1966 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität Graz. Nach der Dissertationsreifeprüfung im Mai 1970 arbeitete ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. G. Zachau am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München an meiner Dissertation.

A

A

C

D

E

h

h

N

N

I

I



